



Impact des obstacles aquatiques sur la migration des jeunes stades d'*Anguilla anguilla*

Tomasz Podgorniak

► To cite this version:

Tomasz Podgorniak. Impact des obstacles aquatiques sur la migration des jeunes stades d'*Anguilla anguilla*. Ecologie, Environnement. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0002 . tel-01306573

HAL Id: tel-01306573

<https://theses.hal.science/tel-01306573>

Submitted on 25 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***Thèse présentée pour l'obtention du titre de DOCTEUR de L'Université de
Bordeaux (2012-2015)***

Ecole Doctorale : Sciences et Environnement

Spécialité : Ecologie évolutive et fonctionnelle des écosystèmes

par Tomasz PODGORNIAK

**« Impact des obstacles aquatiques sur la migration
des jeunes stades d'*Anguilla anguilla* »**

Soutenue le 29.01.2016 devant le jury composé de MM :

Prof Martin Castonguay, Insitut Maurice -Lamontagne.....Rapporteur
Prof Agnès Bardonnnet, UMR ECOBIOP INRA UPPARapportrice
Dr Caroline Durif, Institute of Marine ResearchExaminatrice
Prof Victoria Braithwaite, Pennsylvania State UniversityExaminatrice
Prof Jérôme Cachot, Université de Bordeaux.....Examinateur/ President de Jury

Et des co-directeurs de thèse:

Françoise Daverat (IRSTEA) Fabien Pierron (CNRS) Eric De Oliveira (EDF R&D)

Pour mieux
affirmer
ses missions,
le Cemagref
devient Irstea



université
de
BORDEAUX



Cette thèse a été financée dans le cadre d'une collaboration entre Irstea et EDF R&D (HYNES)

Niniejszą pracę dedykuję moim rodzicom, babci i chrzestnemu

Remerciements :

Je tiens à remercier Eric Rochard et Jean-Charles Massabuau pour m'avoir accueilli au sein de leurs équipes respectives.

Merci aux rapporteurs d'avoir accepté d'évaluer le rapport ci-présent et à tous les membres de jury d'avoir accepté de venir en personne pour examiner mon travail.

Merci à Gregory Maes d'avoir eu l'excellente idée d'analyser le cerveau lors de l'étude préliminaire et d'avoir su se montrer convaincant. La conséquence de cette décision est le rapport ci-présent. Merci également pour toutes ses remarques constructives tout le long de ce projet.

Merci à Simon Blanchet d'avoir contribué, avec ses remarques éclairées, à la valorisation des résultats de cette étude.

Merci aux chercheurs de l'Université de Padoue, en particulier à Massimo Milan, d'avoir effectué l'analyse par puce à ADN et ainsi contribué de manière significative à l'étude pilote.

Françoise, Fabien et Eric, je veux vous faire part de toute ma reconnaissance pour la confiance et la liberté que vous m'avez accordées tout le long de cette thèse. C'était sûrement un grand pari de soutenir ma candidature et de donner la chance à un étudiant dont la vision initiale du projet était comportement-biaisée et dont les connaissances en génétique étaient bien insuffisantes. C'est aussi grâce à vous que je compris que parfois ca vaut le coup de se battre pour ses convictions, même si les décisions que l'on a dû prendre dans le passé étaient censées mettre un terme à toute possibilité de réussite. J'ai vérifié, la leçon que vous m'avez donnée ne figure dans aucune formation doctorale proposée par l'université de Bordeaux. La leçon à laquelle vous avez contribué fait sûrement partie de l'école de la vie et je vous en remercie. Merci également d'avoir accepté de partir de la vision ecologie- et ecotoxicologie-centrée et de vous être aventurés dans les domaines d'écologie comportementale, de neurobiologie et de la cognition animale. Parfois, ca fait du bien d'aller voir ailleurs, paraît-il :)

Merci à Françoise, de m'avoir accepté en tant que son premier thésard. J'espère avoir été à la hauteur. Je te remercie d'avoir partagé avec moi tes connaissances excellentes en écologie, mais aussi d'avoir créé une ambiance dans laquelle j'ai trouvé du confort depuis le tout début de ma thèse. La manière dont tu interagis avec les gens, ainsi que les fous rires dont il t'arrive parfois d'être victime et un certain degré de spontanéité dans ton comportement te permettent de rapidement mettre en confiance ton entourage. Parce qu'après tout, les scientifiques sont aussi des humains :) Tu as également su trouver des solutions pour toutes les contraintes que j'ai pu rencontrer pendant ces trois années, et tu as toujours été disponible pour moi, même avec toute la charge de travail à laquelle tu étais soumise en tant que responsable d'équipe. Tu as également fait preuve d'imagination que tu as su mettre au

service de la science, puisque parfois, il faut dire, il fallait aller chercher loin pour trouver une bonne interprétation. Merci également pour toute la patience et le temps que tu m'as alloué pour renforcer mes convictions et me redonner la motivation pour la suite.

Merci à Fabien de m'avoir transmis ses connaissances en biologie moléculaire, de m'avoir tout enseigné de A à Z. Ou plutôt de a à Z, le « a » étant bien minuscule. Tu n'imagines pas la honte que j'ai eue quand j'essayais de comprendre le fonctionnement de la pipette mes premiers jours à Arcachon. J'ai crû sentir dans l'air le « Punaise, il va y avoir du boulot avec celui-là... ». Aujourd'hui, je suis fier de savoir mettre les cônes à la bonne pipette ! Merci d'avoir éveillé en moi l'intérêt pour la génétique et pour l'épigénétique, mais aussi pour ta curiosité et ouverture d'esprit dont j'ai toujours été fan. Merci pour ta volonté de faire les choses à la perfection et pas juste « à moitié », et pour toutes tes remarques, toujours très pertinentes. Avec le temps, je crois avoir réussi à interpréter correctement ton « je trouve ça hyper intéressant » : si le mot « hyper » reçoit une tonalité forte et la lettre « y » est anormalement prolongée, alors cela veut dire que tu trouves ça hyper intéressant. Par contre, si tout est prononcé de manière standard, alors ça veut dire que ce que j'ai fait est un peu merdique, mais pas d'inquiétude, on trouvera une solution.

Merci à Eric et à toute l'équipe du projet d'HYNES d'avoir rendu toute cette étude possible et d'avoir alloué tous les moyens nécessaires pour la mener à terme. Tu as rempli un rôle d'un connecteur parfait entre l'équipe d'EDF R&D, Irstea et CNRS. Merci de m'avoir supporté depuis le début. C'était bien toi qui m'a appelé en juin 2012, après l'entretien, pour m'annoncer la bonne nouvelle. Quelle joie ! Merci de t'être intéressé à mon profil de près et de m'avoir donné des pistes pour mon avenir professionnel. Merci également d'avoir contribué à ce projet avec tes connaissances, ton esprit critique et ta vision appliquée des choses. Mettre en évidence des trucs, c'est bien, mais quand on peut les mettre en pratique et s'en servir, c'est encore mieux !

Merci à Marion, d'avoir effectué les analyses du muscle dans le cadre de son stage de M2. A part tes qualités en tant que jeune scientifique, tu as aussi des qualités sociales, tu as su créer une bonne ambiance à Arcachon. On n'a quand même toujours pas compris comment t'as réussi à casser la fenêtre à coup de boule !

Merci à Christian, pour ton aide précieuse tout le long de ma thèse. J'éprouve énormément de respect et d'appréciation envers toi. Pour tout ce temps consacré à nos discussions sur l'anguille, pour la manière dont tu as transmis une part de tes connaissances à un doctorant comme moi, en début de thèse et encore ignorant à quel point le monde de l'anguille est un monde à part ! Merci pour ton enthousiasme et la curiosité que tu exprimes envers la science ! J'ai remarqué que ta base endnote est de faible taille, pourtant, à chaque fois quand je te posais une question sur une publi particulière, tu étais capable de me la citer et me la retrouver immédiatement. La vraie base biblio ce n'est pas endnote, c'est TOI ! Et dire que moi je n'arrive même pas à me rappeler du titre de mes propres articles...

Merci à Maria pour son sourire, sa compréhension, sa joie de vivre à l'espagnole et l'énergie à revendre. Toi t'es un peu comme une anguille, ~~t'as du mucus partout~~ tu sais t'adapter à tout le monde. Merci également pour ton aide ces derniers jours avant la

soumission. S'il fallait indiquer un centre social d'Irstea autre que la salle café sauvage, ce serait ton bureau.

Merci à Hilaire, Felix et Maud pour les réponses simples, rapides et efficaces au sujet de l'anguille et des stats, qui m'ont permis un gain de temps considérable, souvent transformé en pauses-clopes allongées.

Merci à Patrick C de m'avoir accepté dans sa station d'expérimentation à Saint Seurin pour plusieurs mois de manips. Merci à Charles et à Pablo, les deux personnes qui m'ont aidé à la station, la première officiellement, la deuxième officieusement. Pablo, s'il existait un rapport entre le temps passé à travailler/ le temps passé à commenter le travail des autres, tu aurais largement explosé les scores. Merci au personnel restant de la station d'avoir contribué à un exercice d'objectivité dans un milieu à interactions sociales complexes.

Merci à Patrick L pour son admiration envers les couleurs des thés et des rafraîchissements non alcoolisés que tu m'as vu absorber durant ma thèse. Merci de m'avoir assuré un jour que « de toute façon, les gens qui boivent pas, c'est pas normal ». Merci de m'avoir accepté d'écouter mes idées et questions farfelues dans ton bureau après 18h, sachant déjà que ça allait être compliqué de te débarrasser de moi en une heure et de ne pas louper tes séances de sport du soir. Merci de savoir parler aux jeunes.

Merci à tous les occupants du couloir du bas pour la bonne ambiance de travail et pour l'odeur quotidienne du café et du chocolat.

Merci à toute l'équipe de la Station d'Arcachon, pour la bonne ambiance, avec ou sans blouse blanche !

Merci à Sarah, Severine et Felix d'avoir partagé le bureau avec moi. Sarah a sûrement eu la tâche la plus difficile, car non seulement elle devait le partager avec moi le plus longtemps, mais aussi aller faire du jogging entre midi et deux, quelque soit le temps.

Merci à Thibaud, Gégé et Vincent pour le séjour agréable au Canada. Bien que Vincent doive encore apprendre à faire tourner la pédale sans tout casser et Thibaud à se battre, vous êtes sur la bonne voie. Merci à Roland et Diana de m'avoir permis de me défouler en sport pendant ces trois années.

Merci à Axel, Vit, Schred et Gone, parce que quand vous êtes là, c'est pas pour sucrer les gaufres. Ne changez surtout rien, le foie, ça se remplace.

Dziękuję Wam, rodzicom, za to że jesteście, i za to że wspieraliście mnie bezwarunkowo i od zawsze.

Dziękuję wujkowi Januszowi za to, że potrafił rozbudzić we mnie zamiłowanie do otaczającej mnie natury i nauczył mnie ją obserwować.

Gracias à mi estrellita, por todo este tiempo precioso que hemos pasado juntos y toda tu atención que me has prestado. Ojala que esto siga.

Resumé:

L'anguille européenne *Anguilla anguilla* est une espèce catadrome avec un cycle de vie complexe incluant des migrations entre la mer de Sargasses et l'Europe et l'Afrique du Nord. On a noté une baisse drastique de sa population depuis les 30 ans et on la considère aujourd'hui comme 'en danger critique'. Une des causes principales de ce déclin est la fragmentation de l'habitat.

Nous avons étudié si les obstacles aquatiques peuvent exercer une pression de sélection sur les jeunes anguilles en migration. On a utilisé une approche sans a priori, où une large liste des gènes a été analysée dans trois tissus de chaque poisson provenant des zones amont/aval de l'obstacle (article 1). On a détecté les différences de transcription des gènes du cerveau des poissons, ces gènes étant liés à la plasticité neuronale. On a également trouvé que ces différences se maintiennent à long terme (article 2). Finalement, on a étudié la relation entre le comportement d'escalade et la transcription des gènes (article 3). Les anguilles provenant des zones amont possèdent une tendance d'escalade la plus forte. De plus, certains poissons classés comme 'leaders' d'escalade présentaient des niveaux de transcription de gènes liés à la cognition plus faibles que les 'suiveurs'. Ces résultats peuvent être associés au concept de coping style et de la personnalité animale. En effet, on suggère que les leaders agissent comme des individus proactifs et téméraires, contrairement aux suiveurs, plutôt réactifs et timides.

L'implication de notre étude est discutée dans le contexte écologique, car la présence des obstacles peut modifier les patterns de distribution de phénotypes dans les réseaux aquatiques.

Mots clés : Anguille cerveau transcription comportement barrages

Abstract :

The European eel *Anguilla anguilla* is a catadromous fish with a large scale migration loop including the Sargasso sea, Europe and North Africa. In the last 30 years, drastic declines of abundance have been observed and the species is currently considered as critically endangered. One of the main causes of species decline is habitat fragmentation, which prevents migrating fish accessing growth zones.

We studied whether aquatic obstacles can enact selectively on migrating young eels. We applied a no *a priori* approach to detect any traits involved in the process of obstacle passage. We used a microarray analysis for gene expression screening in three tissues (brain, liver, muscle) of young eels sampled in different sections of an impounded watercourse (article 1). The only differences detected between groups of fish concerned the brain tissue, and the detected genes were related to synaptic plasticity. We also found that transcription levels of genes related to neural activity, oestrogen and thyroid metabolisms were different after two months of common garden (article 2). Finally, we studied the relationship between the gene transcription and climbing behaviour (article 3). Upstream fish showed the highest climbing tendency. Moreover, we found that the ‘climbing’ leaders showed lower transcription levels of cognition-related gene than fish following them. We suggest that leaders can enact as bold and proactive individuals, in contrast to reactive followers.

The implication of our results is discussed in an ecological context, where the presence of water obstacles can modify the distribution of different phenotypes in the upstream and downstream parts of the water axis.

Keywords: Eel brain transcription behaviour dams

Table des Matières



Remerciements :	ii
Resumé/Abstract :	v
Table des Matières	vii
Lexique des mots :	1
Summary of Chapters	4
CHAPITRE 1 : Contexte de l'étude	10
1. Problématique et mots clés de l'étude	10
2. Espèce étudiée	15
2.1 Cycle biologique et métamorphoses	15
2.2 Facteurs de colonisation continentale	19
2.3 Génétique et plasticité phénotypique de l'anguille Européenne	22
2.4 Déclin de l'espèce	26
3. Obstacles aquatiques et leur impact	28
3.1 Description des obstacles	28
3.2 Multitude d'impact des barrages	30
3.3 Réduction de la libre circulation	31
4. Passes à poissons	32
4.1 Généralités	33
4.2 Passes à anguilles	36
CHAPITRE 2 : Méthodologie	38
1. Site d'étude	38
2. Prélèvement d'échantillons et analyse du transcriptome	42
3. Plasticité neuronale : recherche bibliographique et choix de gènes	46

3.1 Cognition, cerveau et plasticité neuronale chez les poissons.....	46
3.2 Plasticité synaptique : mécanismes impliqués	47
3.3 Le choix de gènes.....	51
CHAPITRE 3 : Etude préliminaire : Puce à ADN	54
1. Introduction Article 1	54
2. Article 1	55
3. Conclusion Article 1	66
CHAPITRE 4 : Les différences entre les groupes persistent-elles ? : Common Garden	69
1. Introduction Article 2	69
2. Article 2	70
3. Conclusion Article 2.....	80
CHAPITRE 5 : Comportement d’escalade et expression génétique :	82
Passé Expérimentale.....	82
1. Introduction Article 3	82
2. Article 3	83
3. Conclusion Article 3	95
CHAPITRE 6 : Conclusion générale	97
CHAPITRE 7 :	109
Bibliographie.....	109

Lexique des mots :

Adaptation locale (*local adaptation*): Processus par lequel l'environnement local exerce des pressions spécifiques sur une fraction de la population (sélection locale), qui se traduira par une modification du pool génétique à la génération suivante. La descendance issue de l'adaptation locale possède une aptitude phénotypique plus forte que 1) les individus issus d'un milieu non soumis à la sélection locale, 2) les individus d'un milieu soumis à une autre adaptation locale ou encore 3) la descendance des parents soumis à la sélection locale sur les traits non héréditaires. Parfois confondue avec le processus d'acclimatation et généralement mise en évidence lors des expériences de common garden ou de translocation.

Approche descendante (*top down approach*): Principe de fonctionnement d'une démarche procédurale, utilisée, entre autres, dans la biologie des systèmes. Cette méthode examine les niveaux de complexité faibles dans le fonctionnement d'un système biologique plus complexe. Elle peut mettre en évidence des interactions entre les gènes et protéines ou des traits plus complexes. Peut être associée à des études « -omiques ». S'oppose à l'approche ascendante (bottom-up).

Aptitude phénotypique (*fitness* ou *individual fitness*): Capacité d'un individu (ou capacité moyenne d'un phénotype) à produire des descendants matures, relativement aux autres individus de la même population et au même moment (voir aussi valeur sélective).

Dépression consanguine (*inbreeding depression*): Reproduction entre les individus apparentés (endogamie). Diminue la valeur sélective des génotypes portés par la descendance car augmente le taux d'apparition des caractères récessifs délétères.

Dérive génétique (*genetic drift*): est l'évolution d'une espèce causée par le hasard. C'est la modification de la fréquence d'un allèle, ou d'un génotype, au sein d'une population, indépendamment des mutations, de la sélection naturelle et des migrations.

Effet fondateur (*founder effect*): a lieu lorsqu'un nombre réduit d'individus se sépare d'une population plus vaste, pour aller coloniser un nouveau milieu. Ces individus ne vont "emporter" qu'un échantillon d'allèles du pool d'allèles de la population mère, et ce, de manière que l'on suppose aléatoire. La nouvelle population peut donc présenter des fréquences génotypiques différentes de la population initiale. Cet écart peut changer

radicalement le profil (allélique, génotypique et phénotypique) de la population fondatrice, par rapport à la population initiale.

Individu clef de voûte (concept de) (*keystone individual concept*) : Le concept dans lequel un petit groupe d'individu ou un individu seul peuvent avoir un effet disproportionnellement large ou irremplaçable dans la dynamique du groupe entier. Ressemble au concept de l'espèce clef de voûte (*keystone species*) (fort impact sur la biodiversité ou fonctionnement de l'écosystème d'accueil).

Leadership : Type d'influence d'un individu sur un groupe, généralement d'une même espèce. Souvent associé aux déplacements en masse des animaux, déclenchés par un petit groupe ou un individu unique. Les individus 'leaders' peuvent présenter des caractéristiques particulières qui leur allouent une capacité à exprimer un comportement 'au bon moment et au bon endroit', qui sera copié par les congénères.

Norme de réaction (*reaction norm*): Ensemble des phénotypes pouvant être obtenus à partir d'un seul génotype dans une gamme d'environnements. L'étendue de la norme de réaction illustre la plasticité phénotypique.

Piège écologique (ecological trap): habitat qu'un organisme trouve plus attractif qu'un habitat alternatif, même si l'aptitude phénotypique qu'il génère est plus faible.

Piège évolutif (*evolutionary trap*): toute ressource qu'un organisme trouve plus attractif qu'une ressource adaptative, même s'il lui confère une aptitude phénotypique réduite. Type de maladaptation.

Plasticité phénotypique (*phenotypic plasticity*) : Différents phénotypes exprimés par le même génotype sous différentes conditions environnementales.

Proximal (*proximate*) : Qui se rapporte aux causes immédiates des comportements (p. ex. physiologiques et neurologiques), événements ou résultats. Souvent utilisé dans les rapports de causalité par opposition à distal ou ultime (*ultimate*).

Recrutement (*recruitment*): Processus par lequel la fraction la plus jeune de la population (de l'œuf au juvénile complètement développé) s'intègre pour la première fois à l'ensemble des poissons accessibles. Chez l'anguille européenne on parle du recrutement des civelles et de l'échappement des anguilles argentées.

Renforcement (processus de) (*reinforcement*) : Dans le contexte de l'apprentissage, le terme renforcement fait référence à l'effet que peut avoir la conséquence d'un geste sur la probabilité qu'il soit répété. Le renforcement peut être positif, s'il augmente la probabilité de répétition; ou négatif, s'il diminue cette même probabilité.

Rhéotaxie (*rheotaxis*) : mouvement d'un organisme en réponse à un courant (d'eau ou d'air). Chez l'anguille, on observe une rhéotaxie positive lors de la migration de montaison et négative au stade adulte (migration de reproduction).

Sélection fluctuante (*fluctuating selection*): type de sélection naturelle dont l'intensité et/ou direction varie sur une courte période de temps et sur le même phénotype. Peut dépendre strictement des facteurs environnementaux (alternance des saisons sèches/de pluie), ou de la fréquence dépendente.

Selection spatialement variable (*spatially varying selection*): Sélection locale intrageneration agissant sur le polymorphisme (homogénéisation à chaque génération).

Shyness-boldness axis : Concept lié à la personnalité animale, permettant de situer les individus en fonction des traits de comportement qu'ils expriment. L'axe concerne les traits timide-téméraire, car ces traits étaient les premiers à être caractérisés dans le contexte de personnalité/tempérament animal.

Thigmotaxie (*thigmotaxis*) : mouvement d'un organisme en réponse au stimulus de l'environnement solide (p.ex. la nage des rats près des parois).

Valeur sélective (*genotypic fitness*) : Mesure, absolue ou relative, du succès d'un génotype au sein d'une population donnée, apprécié d'après sa variation de fréquence entre deux générations (valeur adaptative).

Summary of Chapters

Chapter 1: Context of the study

1. The scope of this study

This study concerns the impact of aquatic obstacles on migrating *Anguilla anguilla* glass eels/elvers. This study was motivated by the dramatic decline of the population over the last 30 years. We assessed the impact of fragmentation as it is considered as a one of the major factors of eel population collapse.

We hypothesized that the distribution of phenotypic patterns can be affected by water obstacles, as the passage by aquatic impoundments can require particular fish capacities OR induce specific reaction norms of the organism.

As European eel is considered as panmictic species with random larval dispersal, we did not expect any local adaptation in fish found upstream vs downstream zones of the impounded river axis. Indeed, even if water obstacles could enact as artificial selection of genetically based traits, the event of random mating as well as the random larval distribution would erase any attempt of local adaptation.

European eel has a very high phenotypic plasticity for many ecologically relevant and life history linked traits. Thus, we first investigated the presence of gene expression patterns in fish found in the downstream vs upstream part of the river. We focused on a specific stage of gene expression cascade; a gene transcription event, sometimes called molecular phenotype.

To describe better the scope of our study, we proceeded by describing each key-word of the title of this thesis.

Impact:

The impact of an environmental factor such as water impoundment could be studied by means of genetic analysis (when fragmentation is expected to enact as artificial selection) or gene expression analysis (if different reaction norms in fish are selected/induced during

their passage through the water dams). Ideally, the latter one should be realized on the same fish before and after the passage through the water obstacles.

Obstacles:

Our study concerns the water impoundments such as dams, but also the fishway devices built on such structures. Indeed, their main function is to increase the flow of fish through the impoundment, but their design needs to take into account the ecology and biology of the targeted fish, as well as the fish ontogenetic stage.

Migration:

The most downstream fish used for the study were caught several kilometers far from the tidal zone, we need to consider that all the individuals have expressed rheotactic migratory behaviour, i.e. swimming actively against the freshwater current.

Glass eels/elvers:

Our study focuses on the glass eel stage. More precisely, all the fish caught during this project were in the transition between the glass eel and elver stage. Indeed, their pigmentation has started but was not completely fulfilled. In the following text, both terms will be used (glass eels and/or elvers).

2. Species studied:

European eel characteristics:

Panmictic population / semelparous reproduction / two transatlantic migrations

During the upstream migration (in search for the habitat for the somatic growth period), fish is thought to depend on its energy reserves (no feeding during migration), to use the olfactory cues (detecting the ‘freshwater molecules’, following the other fish), to avoid densely populated areas, and is able to climb vertical walls. The exact moments of the migratory movement of the whole cohort of glass eels are still hard to predict.

Many studies investigated the presence of genetic patterns according to geographic distribution or temporal migratory waves. It is believed that the environmental selection can enact on different scales (i.e. spatially or temporally varying selection), but any attempt of local adaptation is erased during the following event of reproduction.

3. Aquatic obstacles and their impact:

Although the impact of water impoundment can be multiple, we considered only the effect of the presence of water dams as the obstacle for free flow of fish. In case of migratory fish, this impact can be particularly important, as the access to the specific habitats is often mandatory for the species to fulfill its whole biological cycle. Different types of fishways are known, but the one specifically designed for eels at the juvenile eel stage is the “ladder” type, the glass eel ladder. This device takes advantage of young eels’ ability to go out of the water and climb vertical slopes.

Chapter 2: Methodology

1. Study site

All the fish were sampled on a freshwater artificial corridor in the South-western France, close to our laboratory and experimental station. This corridor connects the Lacanau Lake to the Arcachon Lagoon and is divided by four small or medium water dams. Each water obstacle is equipped by fishway device. We sampled fish at the end of the migration peak (June-July) directly on the fishway and/or below the fishway.

2. Material & Methods

During this project, we assessed the gene transcription levels of brain, hepatic and muscle genes by means of microarray and qRT-PCR analyses. We also run Common Garden experiment (long term maintenance under homogenous conditions) and Experimental Fish Ladder (automatic test for climbing tendency and behaviour). During both experiments, fish were individually identified with mini tags (NONATEC, Lutronics).

3. Neural plasticity: Bibliographical research and the choice of genes

The most common function suggested by the genes detected in the preliminary study (see Chapter 3) concerned neural activity, such as neurogenesis and synaptic plasticity. This function is often involved in cognitive processes, such as environmental cues perception, learning, memorization and decision making process. We investigated scientific literature in 1) cognition related mechanisms such as LTP and 2) cognitive processes in fish in order to chose new, more specific genes and validate our preliminary hypothesis based on differences in cognition-related gene expression in fish found in upstream vs downstream part of the

river. Our choice was also based on the availability of gene sequences in eel (EelBase), and the specificity of designed primers.

Chapter 3: Microarray analysis

We performed a microarray study on fish found in different segments of an impounded water course in order to detect differences in gene transcription levels in brain, liver or muscle tissues. The preliminary results suggested a difference in brain functioning among individuals that successfully crossed the water obstacles and those situated on the downstream part of water dams. These genes are mainly linked to the cognitive function of the brain. It is not known whether gene expression is induced or selected by the passage event. Indeed, transcriptomic analysis provides phenotypic data, but also represents an intermediary step from genotype towards functional phenotype (Fay & Wittkopp 2008). Gene expression can be therefore interpreted as physiological acclimation or phenotypic plasticity (Aubin-Horth & Renn 2009; Giger et al. 2006), whereas other studies would use it clearly as indicators of adaptive divergence (Derome *et al.* 2006; Larsen *et al.* 2007; Roelofs *et al.* 2009). However, raising relevant conclusions from such data is crucial for conservation strategies (Hansen 2010; Vandersteen Tymchuk et al. 2010). In our case, all individuals could present different pre-established transcriptomic profiles before meeting the first impoundments, as well as they could temporarily differentiate only while crossing the obstacle. What we call here a temporal regulation of gene expression is more generally termed as phenotypic plasticity or flexibility (Piersma & Drent 2003), whereas pre-established molecular phenotypes selected by environmental conditions would stand for spatially varying selection. In order to assess the persistence of detected gene transcription levels, a long-term maintenance of fish under homogenous conditions is needed.

Chapter 4: Common Garden Experiment

We ran a Common Garden experiment in order to decipher genetic and environmental components of variation in molecular profiles detected in the preliminary study. Ideally, the analysis of gene transcription levels should be performed on the same fish before and after the experiment. However, brain extraction and analysis being lethal, we needed to consider the relative differences in molecular profiles of fish from the preliminary study (coming from the same sampling sites, sacrificed immediately on the field) as the profile differences expected in fish ‘before’ the Common Garden (je parle bien de ‘différences relatives entre les profils et

pas de profile eux-mêmes). We found that even after two-month rearing under homogenous conditions, fish sampled in the upstream part of the river expressed higher transcription level of genes related to cognitive function. These patterns are similar to the differences found in the preliminary study, which suggest a rather long term mechanism of gene expression regulation. Indeed, the differences detected can have genetic or epigenetic basis.

Chapter 5: Experimental Fishway Test

We ran an Experimental Fishway study in order to detect differences in climbing tendency and behaviour of glass eels/elvers sampled along the impounded river axis. We also measured the transcription profiles of new genes related to cognitive function, as this function has been detected to differ among upstream and downstream fish groups. Each fish was individually identified (NONATEC , Lutronics) and tested four times (4 x 300min) in a group of fish with mixed sampling origin. During our test, we assessed the climbing tendency (i.e. the total number of fishway ascension), the mean order in which the fish ascended the fishway for the first time (allowing creation of classes called leaders, followers, finishers and no-climbers), as well as the repeatability of both climbing tendency and behaviour of each fish. Fish from the upstream part of the river had higher climbing tendency and behaved in a more consistent way than the fish from the downstream segments. We also found that the group of fish from the most downstream part (i.e. naïve to obstacles crossing) did not contain any individual classified as leader. We suggest that during the migration peak, the ‘leader’ individuals are among the first fish to cross the obstacle and reach the most upstream segments of an impounded water course. Thus, the likelihood of sampling a leader in downstream zones at the end of migration peak is low. An alternative hypothesis concerns the experience the fish could acquire during the obstacle passage. Fish become a leader once it has crossed the obstacle in the field. We also suggest that the ‘leader’ behaviour can be associated with the coping styles the animals adopt to deal with environmental stress, or with personality traits the animals express throughout their life. Indeed, proactive and bold fish would prone to explore a new, potentially risky zone without any social cues, which was the case of leaders. Alternatively, reactive and rather shy fish would be associated with followers. These fish spend more time assessing the environment and are able to correctly adjust their behaviour in front of new conditions by means of behavioural flexibility. Their cognitive capacities (cues perception, learning efficiency, and memory) are thought to be higher than those of the proactive fish, which is in agreement with our results. Indeed, the transcription

levels of cognition related genes were higher in the group of followers in comparison to the group the leaders.

Chapter 6: Conclusion

Our study showed the differences in climbing behaviour and gene transcription levels among the fish found in the upstream and downstream parts of the river. Surprisingly, gene transcription differences do not concern the muscle neither liver tissue, but the fish brain. The main function of the detected genes involves neural activity such as synaptic activity and neurogenesis, which in turn can be linked to the cognitive processes, such as cues perception, learning or memory. Moreover, the fish groups differ in climbing tendency and behaviour. Glass eels with higher climbing propensity were found in the upstream zones, which could be explained by the experience of water crossing acquired in the field, but also linked to the behavioural strategy the fish adopt to deal with the environment. For example, bold and proactive fish would be more likely to express an exploratory behaviour without any social cues, thus in a potentially risky situation. This behaviour could be associated to the fish classified as leaders. In contrast, the followers would express a rather shy and reactive behaviour, and they would first require assessing the environment before they adjust their behaviour to the new environmental challenge. Therefore, they could require the cognition related genes at a higher level than the proactive leaders. Although, gene transcription levels found in leaders and followers support this hypothesis, further study at the level of the whole organism (i.e. reversal learning, behavioural flexibility) are needed (Figure 21).

It is noteworthy that the leaders were present only in the upstream segments of the water course. We suggest that these proactively behaving fish are among the first to climb the obstacles in the field, and they could enact as ‘keystone individuals’ in the whole group of migrating young eels. In other words, they would initiate and encourage the climbing movement of the glass eel cohort. We believe that the presence of leaders in the groups of obstacle-naïve fish could be taken into account to predict more accurately the migration peaks in the future.

Finally, we found that differences in gene transcription levels persist for a relatively long period, which suggest their genetic or epigenetic basis. In order to assess whether water obstacles enact as a selective pressure on genetically based phenotypes or induce

epigenetically regulated reaction norms in climbing fish, genetic and epigenetic analyses are proposed for further studies.

CHAPITRE 1 :

Contexte de l'étude

1. Problématique et mots clés de l'étude

L'étude décrite ici concerne les effets des obstacles le long des cours d'eau sur les anguilles lors de leur migration de montaison. L'anguille européenne *Anguilla anguilla* est une espèce catadrome facultative, effectuant deux migrations transocéaniques, ces déplacements étant liés d'abord à la recherche d'un milieu propice à la croissance (colonisation des milieux d'eau douce ou saumâtres continentale), puis ensuite à la reproduction dans la Mer de Sargasses, lieu unique de fraie. Cette étude se justifie par le déclin drastique de la population de l'espèce et la prise de conscience de l'impact de la fragmentation des corridors aquatiques sur les espèces de poissons migrateurs. Bien que la fragmentation du milieu soit considérée parmi les causes principales de ce déclin, peu d'études portent sur les conséquences des obstacles aquatiques sur la qualité des individus et la distribution des patterns phénotypiques de l'espèce. L'anguille est également un modèle d'étude particulier lorsque l'intérêt porte sur la plasticité phénotypique et l'hétérogénéité environnementale du milieu. En effet, l'anguille présente une très large distribution géographique, mais il s'agit d'une population unique au pool génique homogène à l'échelle de l'espèce entière, cette caractéristique étant assurée par la panmixie et la dispersion aléatoire des larves. Elle peut être soumise à des facteurs de sélection spatialement variable, mais qui n'aboutissent pas à une **adaptation locale**. Cependant, dans certains cas où la sélection locale est récente, forte (p.ex. piège écologique) et constante, on peut s'attendre à des changements dans la diversité phénotypique et ainsi du pool génétique ou épigénétique. Notre étude se situe dans un contexte précis, défini par la description des mots clés du titre du projet (Figure 1).

Impact des obstacles aquatiques sur la migration des civelles

Figure 1) Les mots clés du titre de la thèse.

Impact

L'impact des installations aquatiques sur les espèces migratrices peut être classé pour la plupart des études comme indirect (retard dans la colonisation de l'habitat, densité/mortalité accrue d'une part ou d'autre de l'obstacle, ou encore les modifications des paramètres physico-chimiques de l'habitat, impact sur la dynamique metapopulationnelle) ou direct (franchissabilité ou sélectivité, c'est-à-dire le nombre d'individus ayant franchi l'obstacle par rapport au nombre total présent ou nombre total ayant tenté de le franchir) (Castro-Santos 2004; Kemp 2012; Marmulla 2001; Noonan *et al.* 2012). L'aspect quantitatif de la franchissabilité de l'obstacle est généralement le premier à recevoir l'attention, cependant aucune étude n'a abordé ce sujet sous son aspect qualitatif (Cote et al. 2009). En effet, même si la construction des passes spécifiques à l'espèce a été engendrée par la mise en évidence de la sélectivité interspécifique des installations (Agostinho *et al.* 2007; Gephard & McMenemy 2004), très peu d'études concerne les différences intraspécifiques entre les individus ayant franchi les barrages et ceux restés en aval. La présente étude se veut donc parmi les premières à adopter une approche individu-centrée et qualitative de la sélectivité des barrages chez une espèce migratrice, l'anguille.

Dans le contexte de notre étude, l'impact d'une contrainte environnementale peut être vu sous deux angles différents. Tout d'abord, comme tout facteur environnemental, une contrainte à la migration peut, *via* la plasticité phénotypique, aboutir à une nouvelle variante du phénotype issue d'un même génotype. Autrement dit, l'interaction génotype X environnement peut influencer l'expression génétique de l'individu de manière à produire un nouveau phénotype, parfois mieux adapté à l'environnement dans lequel l'individu se trouve. Dans ce cas, on s'attend par exemple à ce que le groupe d'individus au pied du barrage présente, pour un trait quantitatif dont l'expression est susceptible d'être induite (inhibée ou stimulée) par le passage par l'obstacle, un nombre de **normes de réaction** similaires au groupe ayant passé l'obstacle, mais dont la valeur moyenne du trait serait différente. Par exemple, si le passage par les obstacles est un événement stressant, on pourrait observer une augmentation du niveau de cortisol sanguin dans le groupe amont, quelle que soit leur niveau initial, par

rapport aux individus situés en aval. Idéalement, pour détecter le phénomène d'induction d'un phénotype par la composante environnementale, on a recours à des méthodes utilisées traditionnellement en médecine, c'est-à-dire l'analyse d'un trait chez le même individu avant et après sa soumission au facteur étudié (médicament, pathologie). Ici, la contrainte principale concerne la technique d'analyse du trait, obligatoirement non-létale. L'avantage par contre vient du fait qu'il n'est pas nécessaire d'étudier le génotype de l'individu, mais ses traits phénotypiques (comportement de l'individu entier ou expression génétique d'un tissu).

L'impact d'une contrainte environnementale peut être également sélectif. On parlera alors d'une sélection anthropique, le facteur étudié étant la conséquence de l'activité humaine. Trois types de sélection sont possibles : stabilisante, disruptive ou directionnelle. Ici, on considérera l'impact comme sélectif *sensu stricto* uniquement si on peut établir une valeur sélective* (survie X fécondité) d'un génotype dont le phénotype est soumis à la sélection. De même, le trait sélectionné sera adaptatif si, à l'issue de cette sélection, il sera toujours présent dans la descendance et il ne sera pas contre-sélectionné par le même facteur environnemental (cas particuliers de **sélection fluctuante**).

Obstacles

Notre étude considérera les obstacles uniquement comme une entrave anthropique empêchant l'accès des anguilles aux habitats situés en amont. De plus, on s'intéressera aux dispositifs équipant les barrages, dont le but est d'assurer la continuité de la route migratoire en présence d'aménagements. Les passes elles-mêmes peuvent imposer certaines contraintes aux poissons avant qu'ils puissent accéder aux segments amont. Une passe à poissons nécessite tout d'abord que l'individu, une fois l'entrée de l'installation trouvée, la considère suffisamment attractive pour l'explorer (Steffensen et al. 2013). De plus, les passes inclinées de type 'passe à anguille' requièrent aussi l'expression d'un comportement d'escalade de l'individu. Ainsi, notre étude de l'impact des obstacles a concerné les passages 'sous conditions' imposés par ces installations de franchissement des barrages. Nous nous sommes intéressés alors à identifier d'éventuelles différences entre les traits individuels des poissons retrouvés en amont de l'obstacle par rapport à ceux restés en aval. En d'autres termes, notre étude s'est intéressé à évaluer la transparence des passes à anguilles par une analyse qualitative des traits individuels.

Migration

Toutes les civelles en migration n'aboutissent pas au pied de l'obstacle. Une partie de la cohorte reste pendant toute la période de croissance dans les zones saumâtres, dans les estuaires et dans les zones soumises à marée, et une autre partie se sédentarise tout au long de la remontée vers l'amont des axes fluviaux. Notre étude concerne uniquement les individus ayant abouti au moins au niveau du premier obstacle (Figure 13), c'est-à-dire ayant exprimé un comportement de nage active à contre-sens du courant dans les zones d'eau douce. Il est difficile d'évaluer quelle est la fraction d'individus à comportement de migration en amont versus ceux établissant leur habitat de croissance dans les zones saumâtres. Aucun outil n'existe pour évaluer *in situ* cette tendance migratoire chez les individus. De plus, la pêche civelière, toujours en activité, pourrait agir sur les proportions de migrants amont/sédentaires arrivant chaque année sur le plateau continental. Il est également à noter qu'auparavant, toute civelle était considérée comme migratrice obligatoire, et ce n'est que récemment (Daverat *et al.* 2006a; Marohn *et al.* 2013; Tsukamoto & Aoyama 1998) que les analyses microchimiques des otolithes ont mis en évidence la croissance de certains individus uniquement dans les zones estuariennes. En effet, la montaison de l'anguille est désormais considérée comme facultative. Ainsi, les individus concernés par notre étude pourraient être classés comme civelles/anguillettes au comportement rhéotactique positif, mais nous ne pouvons pas savoir s'ils auraient exprimé un comportement nomade ou résident plus tard, lors de leur période de croissance (Daverat *et al.* 2006a).

Civelles/anguillettes

La migration amont le long des axes aquatiques s'effectue au stade civelle et anguilllette. La principale différence visible à l'œil nu réside dans la pigmentation tégumentaire. Il est donc facile de sélectionner les individus au stade civelle lors des échantillonnages de terrain. Cependant, certains individus se présentent au pied du barrage déjà à l'état légèrement pigmenté. Le temps qu'ils mettent à parcourir le tronçon de rivière jusqu'au site d'échantillonnage peut être variable, il dépendra entre autres de la distance parcourue et éventuellement de la présence d'autres entraves à la migration en aval du site. Ainsi, les individus sélectionnés pour notre étude ont été considérés comme civelles ou en phase de transition entre le stade civelle/anguilllette et présentaient tous un stade de pigmentation compris entre VIA0 et VIB. Notre principal critère était la taille maximale de l'individu (12cm), considérée comme taille moyenne limite procurant à l'individu la possibilité d'une escalade de parois verticales (la cohésion au substrat étant assurée par

l'interaction physique entre le mucus corporel et la couche d'eau du substrat) (Legault 1986, 1988), et donc le passage de certaines parties des obstacles aquatiques.

Tout le long de cette thèse, on a adopté une démarche schématisée sur la Figure 2. Tout d'abord, une étude sans *a priori* a été effectuée (analyse par puce à ADN), qui nous a permis de préciser la fonction principalement affectée par les obstacles de notre site d'étude. Les différences détectées au niveau du cerveau, correspondant aux fonctions liées à l'activité synaptique et neuronale nous ont conduit à faire une recherche bibliographique sur le thème de la cognition et du comportement animal. On a également effectué une expérience de Common Garden afin de vérifier la persistance de différences détectées lors de l'étude préliminaire. Ensuite, on a examiné le comportement des individus face au dispositif de passage (Test de Passe Expérimentale), couplé avec une analyse des gènes spécifiques aux fonctions précédemment détectées.

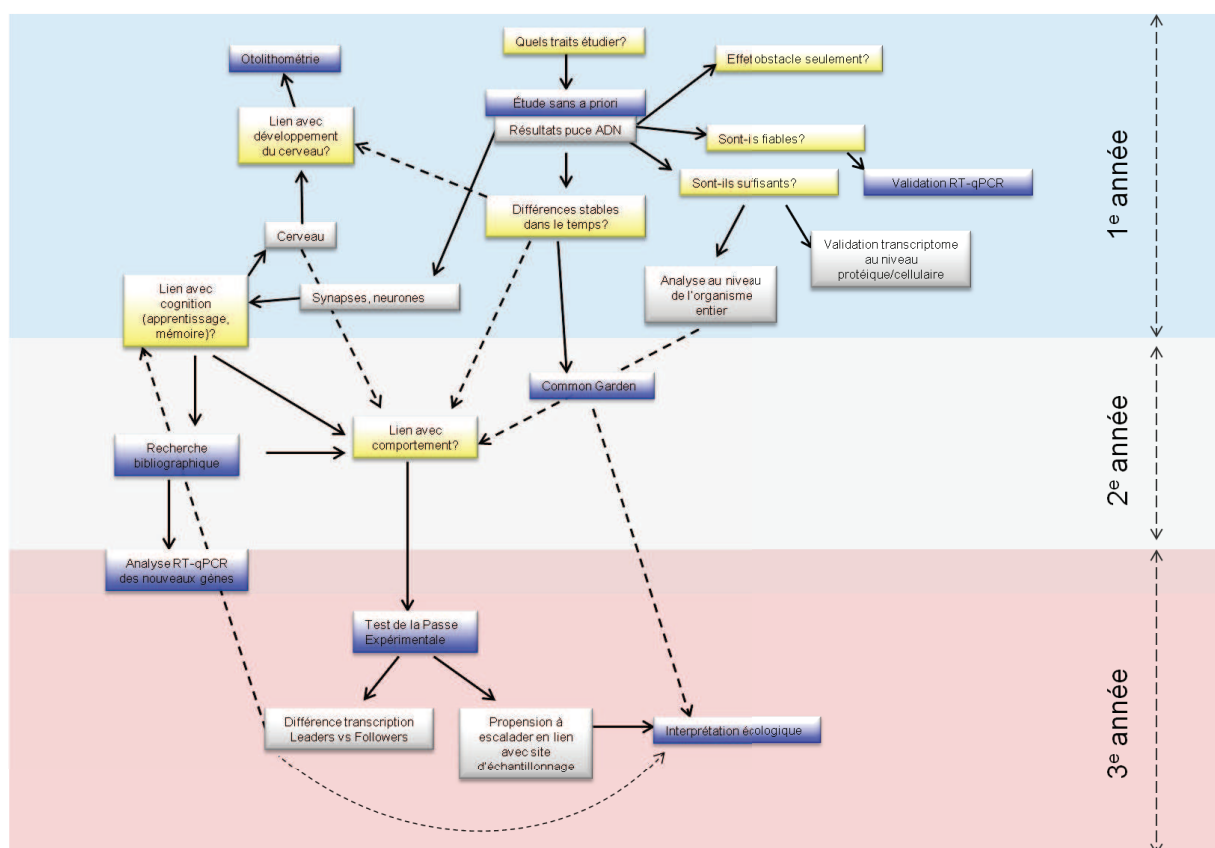


Figure 2) Schéma de la démarche suivie le long de la thèse. Les rectangles bleus correspondent aux analyses effectuées, les rectangles jaunes correspondent aux questions posées. Les rectangles sont positionnés sur trois zones de couleur de fond différente, permettant de les situer chronologiquement.

2. Espèce étudiée

2.1 Cycle biologique et métamorphoses

L'anguille fait partie du superordre des Elopomorphes, un taxon phylogénétique situé parmi les plus anciens chez les Téléostéens. Les Elopomorphes sont caractérisés par une phase larvaire dite leptocéphale et leur habitat est généralement marin (Pfeiler 1999). L'un des quatre ordres des Elopomorphes, les Anguilliformes concerne le genre *Anguilla* qui recense une vingtaine d'espèces dans le monde, réparties dans tous les océans, excepté l'Atlantique Sud et le Pacifique Est (Minegishi *et al.* 2005; Tsukamoto & Aoyama 1998).

L'anguille européenne *Anguilla anguilla* (Linné, 1758) a un cycle biologique similaire à toutes les espèces d'anguilles « vraies ». La reproduction se fait dans l'océan, et les larves leptocéphales migrent jusqu'au talus continental pour se métamorphoser en civelles (Schmidt 1923) (Figure 3). Ensuite, la civelle envahit les eaux continentales, et se pigmente progressivement jusqu'au stade anguillette (petite anguille jaune). Commence alors une phase de croissance continentale, qui se termine avec le début de la maturation sexuelle (ou argenture).

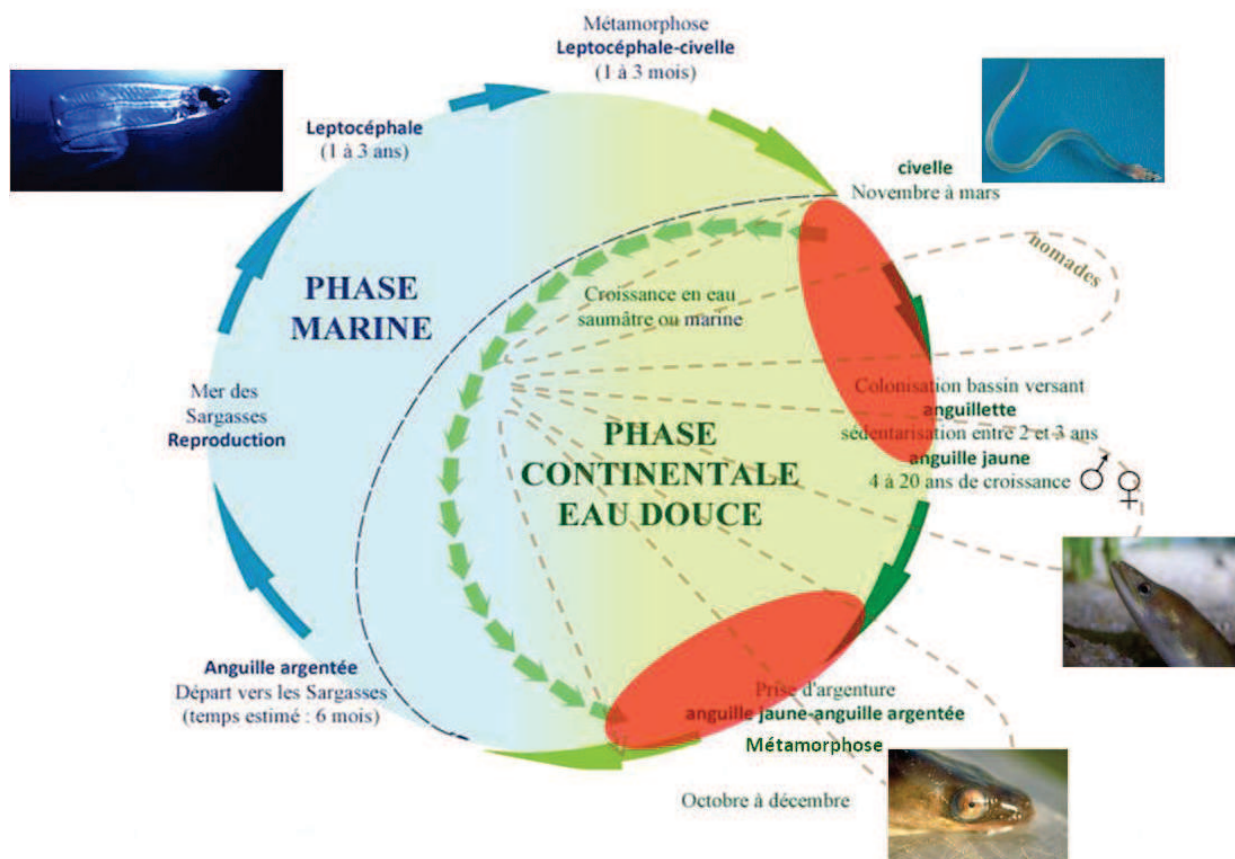


Figure 3) Cycle de vie de l'anguille européenne, adapté de (Geffroy 2013). On observe une migration entre la Mer de Sargasses et le plateau continental/eau douce dans les phases précoces de la vie de l'individu et une migration de retour en Mer de Sargasses lors de la phase adulte. La plupart des individus est confrontée aux mêmes obstacles aquatiques (en rouge) à deux reprises, d'autres jamais (croissance en milieu marin/saumâtre). Il existe également des individus « nomades » (Daverat & Tomas 2006; Tsukamoto & Aoyama 1998), effectuant un passage multiple dans l'eau douce (tracé discontinu).

Au stade argenté, l'anguille s'engage dans une nouvelle migration vers le site de reproduction océanique. On observe donc deux grandes migrations transocéaniques au cours de la vie d'un individu. Chaque migration est accompagnée d'une métamorphose, un bouleversement profond de la morphologie, du comportement et de la physiologie de l'individu. En effet, chacune de ces métamorphose prépare l'individu et lui confère une bonne adaptation à l'habitat dans lequel il va se retrouver.

Tout d'abord, lors de la phase leptocéphale, l'individu possède une forme aplatie, ce qui lui faciliterait les voyages océaniques au gré des courants (Kettle *et al.* 2008) ou la migration verticale (Castonguay & McCleave 1987; Miller *et al.* 2015). L'individu au stade leptocéphale ne ressemble pas à sa forme adulte et a pendant longtemps été considéré comme appartenant à une espèce à part (*Leptocephalus brevirostris*). Le rapprochement entre ce stade et *A. anguilla* a été relativement récent (Grassi 1896). La transparence de son corps lui assurerait une détection visuelle plus faible par les prédateurs. Sa constitution corporelle est faible en muscle (Bonhommeau *et al.* 2009), mais très riche en glycoaminoglycanes (GAG) (Pfeiler 1999), des composés qui fourniront des polysaccharides nécessaires à la métamorphose et à la phase de migration au stade civelle pendant lequel l'individu ne s'alimente pas. En effet, bien que la larve leptocéphale se nourrisse tout au long de sa traversée océanique, elle ne consomme que 50% de l'énergie assimilée (Lecomte-Finiger *et al.* 2004).

Les larves d'anguille européenne arrivent sur la zone qui s'étend sur toute la façade maritime du Nord de l'Islande au Sud du Maroc et de l'Ouest des Açores jusqu'à la mer Noire et les bassins versants associés (Schmidt 1923) (Figure 4). Leur arrivée est enregistrée tout au long de l'année, mais d'importants pics de migrations sont observés d'octobre à mars. Commence alors l'un des phénomènes les plus spectaculaires, visible encore il y a 30 ans. Les individus, une fois métamorphosés en civelles, se rassemblaient en cordon et effectuaient une nage active à contre-courant (Cantrelle 1984). Cette stratégie, qui ressemble fortement au peloton des coureurs du Tour de France, aurait pu être mise en place pour assurer

l'hydrodynamisme du groupe et donc économiser l'énergie nécessaire à la nage. Les civelles auraient-elles aussi leurs propres « *leaders*¹ », aidés par les « *poissons pilotes* » et suivis par les « *gruppettos* » ? Lors de la première métamorphose, la forme de l'individu commence à ressembler à celle de l'individu adulte. On observe une perte importante de l'eau corporelle, le corps s'amincit pour adopter une forme sub-cylindrique dite anguilliforme. Là encore, on observe une adaptation parfaite de l'espèce à une nouvelle phase de vie, cette fois liée aux contraintes hydrauliques de l'habitat. Le corps mince et allongé permet à l'individu une nage active à contre-courant, nécessaire pour atteindre les zones amont des rivières. Il permettra également de s'enfouir facilement dans le substrat lors du repos ou de l'inversion des marées. La capacité d'enfouissement permet à l'individu un transport tidal sélectif, c'est-à-dire d'utiliser préférentiellement les courants de flot (marée montante) pour traverser les estuaires (Gascuel 1986; McCleave & Kleckner 1982) tout en économisant de l'énergie (Hickman 1981). Lors de la phase civelle, d'autres changements ont également lieu. Les fortes capacités d'osmoregulation permettent à l'individu de survivre dans de l'eau douce et les comportements de **thigmotaxie** et de **rhéotaxie** se mettent en place pour assurer à l'individu une bonne orientation lors de la migration de montaison, face au courant et en direction de l'eau douce. Chez les civelles, l'estomac se rétrécit, l'individu ne se nourrit généralement pas ((Charlon & Blanc 1983; Desaunay & Guerault 1997) mais voir (Bardonnnet & Riera 2005)) et puise de l'énergie pour la migration dans les réserves stockées lors de la phase larvaire océanique. La reprise alimentaire se mettra en place plus tard et sera marqué par une pigmentation avancée, le développement de l'intestin et de la denture (Vilter 1945), ce qui mettra fin au stade civelle. Il correspond à la pigmentation totale du corps et au passage au stade anguillette, ou jeune anguille jaune, au cours duquel la croissance reprend, permettant une augmentation forte du facteur de condition (Tesch & Thorpe 2003). Les anguillettes peuvent toujours exprimer un comportement migratoire et participer à la colonisation du bassin versant, probablement à la recherche d'un habitat propice pour la croissance (Feunteun *et al.* 2003). Le choix de l'habitat de croissance semble crucial pour **l'aptitude phénotypique** de l'individu, car il permettra d'acquérir des réserves énergétiques suffisantes pour la migration de reproduction et la maturation des gonades (van Ginneken & Maes 2005; Van Ginneken & Van den Thillart 2000). Des études basées sur la microchimie des otolithes (Daverat *et al.* 2006a; Daverat *et al.* 2005; Tsukamoto & Aoyama 1998) ont montré que certains individus ne rentrent jamais en eau douce, ils effectuent donc l'ensemble de leur

¹ [*leaders/poissons pilotes/gruppettos* : langage de cyclisme, définissant la position des coureurs dans le peloton](#)

cycle de vie dans le milieu saumâtre. De plus, la croissance d'individus en milieu saumâtre est meilleure qu'en milieu d'eau douce dans la plupart des milieux tempérés. Quel est donc l'objectif de cette migration facultative en amont ? Serait-elle un vestige d'une adaptation ancienne?

On observe généralement un gradient de densité décroissant de l'aval vers l'amont (Edeline *et al.* 2009), certains individus pourraient se sédentariser au fur et à mesure de la migration. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette répartition de la colonisation, comme par exemple la tendance migratoire dépendante de la densité (Ibbotson *et al.* 2002), de la condition énergétique des individus (Bureau du Colombier *et al.* 2007; Geffroy & Bardonnnet 2012) ou des stratégies comportementales majeures adoptées par chaque individu (Feunteun *et al.* 2003; Geffroy *et al.* 2015). D'une manière générale, les individus cherchent à éviter des zones à forte densité. Là encore, l'évitement de la surpopulation du milieu pourrait être adaptatif, car réduirait la compétition intraspécifique et le cannibalisme (Degani & Levanon 1983; Domingos *et al.* 2006) lors de la phase de croissance.

Pendant la phase de croissance, dont la durée varie en fonction du sexe et de l'habitat (Tesch & Thorpe 2003), les anguillettes deviennent progressivement anguilles jaunes, avec une coloration jaunâtre du ventre caractéristique de ce stade. La phase de maturation (argente) marque la fin de la phase de croissance. Les mâles s'argentent généralement plus jeunes et à une taille inférieure à celle des femelles (Vollestad 1992). Là encore, de nouvelles adaptations se mettent en place pour permettre à l'individu d'entamer une phase de migration de dévalaison en direction de la Mer des Sargasses, lieu de reproduction unique de l'espèce. La partie ventrale du corps s'argente et devient caractéristique de nombreux poissons marins, la paroi de la vessie natatoire s'épaissit pour permettre une nage à de fortes profondeurs et les yeux s'agrandissent (Nowosad *et al.* 2014; Van Den Thillart *et al.* 2007; Van Ginneken *et al.* 2007).



Figure 4) Carte de répartition de l’anguille européenne et américaine (Schmidt 1909).

2.2 Facteurs de colonisation continentale

Dans le cycle de vie de toutes les espèces animales il existe une étape permettant une dispersion des individus en dehors de leur zone de naissance. Cette dispersion permet de diminuer la probabilité de reproduction avec les individus au profil génétique proche, et ainsi éviter le phénomène de **dépression consanguine**. La dispersion permet également de réduire la compétition pour des ressources limitées entre les membres de la même famille. En effet, le phénomène de dispersion implique que certains individus restent à l’endroit que d’autres quittent. La migration, au contraire, est définie comme le mouvement d’une population entière d’un habitat à l’autre. Certaines espèces animales ne migrent qu’une seule fois dans leur vie (p.ex. les vulcains *Vanessa atalanta*), d’autres effectuent une migration aller-retour, souvent liée aux stades de croissance et de reproduction (saumons, anguilles), d’autres encore effectuent des migrations multiples.

Chez les poissons, on distingue trois types de migration. Les poissons océanodromes effectuent leur migration tout en restant en eau de mer. Les poissons potamodromes migrent uniquement entre les zones d’eau douce. Les poissons amphihalins ou diadromes effectuent une migration entre l’eau de mer et l’eau douce. Parmi les poissons diadromes, on distingue trois types de migrateur en fonction de leur milieu de reproduction et croissance. Les

migrateurs anadromes (p.ex. les saumons), se reproduisent en eau douce, mais effectuent leur période de croissance en eau de mer, alors que les migrateurs catadromes (p.ex. certaines anguilles) fraient en eau de mer, mais effectuent leur croissance en eau douce ou saumâtre. Le troisième type des migrateurs diadromes concerne les amphidromes, effectuant des migrations entre les deux milieux aquatiques sans qu'elles aient pour but la reproduction.

Concernant l'anguille européenne, toute civelle arrivée sur le plateau continental doit être considérée comme migratrice, car elle a déjà effectué la plus longue partie de son premier voyage. Toutefois, certains individus se sédentarisent plus rapidement que d'autres, car ils n'expriment pas le comportement de nage active à contre-courant pour coloniser la zone amont de l'eau douce. De plus, une fraction importante de la population (30 à 41 %) effectue des mouvements entre milieu d'eau douce et marin plusieurs fois pendant leur cycle de croissance (Daverat *et al.* 2006a; Daverat & Tomas 2006). Il convient alors de considérer l'anguille comme catadrome facultative ou encore amphidrome (Daverat *et al.* 2006a).

Compte tenu du fait que des nombreux traits caractérisant la civelle auraient pour objectif d'économiser de l'énergie lors de son déplacement, la quantité d'énergie stockée chez les individus pourrait être parmi les facteurs majeurs contrôlant le comportement migratoire des individus. A l'approche de la côte, de nombreuses civelles utilisent le transport tidal sélectif (Gascuel 1986; McCleave & Kleckner 1982; McCleave & Wippelhauser 1987), mais certaines civelles auront un comportement de nage à contre-courant même pendant le jusant (Creutzberg 1961). Les individus adoptant une nage à contre-courant et un fort comportement migratoire auraient un facteur de condition corporelle et un niveau d'hormones thyroïdiennes plus élevée que les autres (Edeline *et al.* 2005; Edeline *et al.* 2004; Edeline *et al.* 2009).

Une partie des individus se sédentiserait dans les zones océaniques ou saumâtres, faute de réserves énergétiques suffisantes pour assurer la nage à contre-courant dans les zones d'eau douce. Ces individus pourraient bénéficier d'une croissance compensatoire (Geffroy & Bardonnnet 2012), c'est -à-dire une augmentation de leur facteur de condition suite à la sédentarisation, due d'une part à l'investissement de l'énergie restante dans la croissance, et à une abondance des ressources alimentaires d'autre part. En effet, il est généralement admis que les zones saumâtres sont plus productives que les zones d'eau douce (Thibault *et al.* 2007).

Un autre facteur mis de l'avant pour expliquer la colonisation continentale des civelles est la densité des individus dans le milieu. La dynamique migratoire de chaque cohorte

suivrait un modèle diffusif (Ibbotson *et al.* 2002; Smogor *et al.* 1995), hypothèse émise surtout dans le cas d'étude des mouvements de l'anguille jaune (Feunteun *et al.* 2003). La taille du corps est également évoquée (Imbert *et al.* 2008; Moriarty 1986; Naismith & Knights 1988; White & Knights 1997), car elle est associée au stade de l'individu. En effet, le comportement migratoire diminue avec l'augmentation de la taille, et la vitesse de colonisation de l'habitat ralentit voire s'estompe chez les individus de plus de 30 cm, au stade anguille jaune. La taille du corps ne joue pas seulement sur la tendance de nage à contre-courant, mais pourrait être vue comme facteur physique limitant lors de la colonisation des axes où les obstacles aquatiques sont présents. En effet, pour passer certains obstacles, les individus expriment un comportement d'escalade sur les parois verticales, en dehors de l'eau. L'escalade est possible uniquement dans les parties humides, le mucus sécrété par le corps de l'individu lui permet de se coller littéralement à la surface mouillée. Ce phénomène physique de cohésion entre le mucus et les molécules d'eau permet de supporter un poids limité, généralement atteint chez les individus de plus de 12 cm (Legault 1986, 1988).

Le comportement migrateur et ainsi la dynamique de la colonisation peuvent être influencés par d'autres facteurs externes tels que la température, la lumière, la salinité, l'odeur de l'eau douce ou l'odeur des individus en amont. Une étude à long terme (13 ans) portant sur la migration des civelles dans la rivière Imsa (Norvège) a montré une corrélation positive entre le taux de recrutement et la moyenne des températures annuelles (Vollestad & Jonsson 1988). La température joue aussi sur le comportement alimentaire des individus (Charlon & Blanc 1983; Edeline *et al.* 2009; Fontaine & Callamand 1941) qui arrêtent de se nourrir aux températures inférieures à 10°C. Il existerait une température seuil de 5°C (Elie & Rochard 1994) au-dessous de laquelle les individus cessent tout mouvement et rentreraient en dormance. Entre 5-12°C, les civelles expriment une nage liée au transport tidal sélectif, qui devient une nage active au-dessus de 12°C (Gascuel 1986). En effet, le comportement de passage par les obstacles aquatiques peut être observé également à partir de cette température, mais les pics d'escalade des barrages se situent plutôt à des températures plus hautes que ceux des pics de l'activité de nage (Linton *et al.* 2007). Chez l'anguille, comme tout animal ectotherme, la température influence les mécanismes physiologiques tels que l'activité des enzymes ou la fluidité des membranes cellulaires (Johnston & Dunn 1987). Avec la baisse de la température, on observe également une diminution de l'activité du cerveau des poissons (Chaube & Joy 2002), qui pourrait accentuer l'impact sur les capacités de nage (le Bras 1979). Chez l'anguille, le taux circulant d'hormones thyroïdiennes est positivement corrélée avec la

synthèse de la thyroïde (Leloup 1958), or l'activité de l'hormone thyroïdienne aurait une influence sur la propension des civelles à migrer vers l'amont (Bureau du Colombier *et al.* 2007; Edeline *et al.* 2005; Edeline *et al.* 2004; Imbert *et al.* 2008).

Quel que soit le stade, l'anguille exprime un comportement photonégatif. Elle enregistre une forte activité principalement de nuit, même s'il est possible d'observer des individus en migration de montaison (escalade des parois) ou de dévalaison durant le jour (Durif *et al.* 2003; Tesch & Thorpe 2003). Certaines études ont suggéré que les variations saisonnières de la photopériode seraient un signe déclencheur de l'activité migratoire (Edeline *et al.* 2009; Fontaine & Callamand 1941).

La capacité d'olfaction des anguilles est spectaculaire, au stade civelle elle est comparable à celle d'un chien (Tesch & Thorpe 2003). En effet, l'odeur de l'eau douce permettrait à la fois de déclencher l'activité migratoire, mais également d'orienter les civelles soumis aux courants de flot et de jusant vers les zones entrée d'eaux douces (Creutzberg 1959, 1961). Les civelles pourraient s'orienter également à l'aide d'un gradient de salinité (déplacement vers les zones à faible salinité), ce facteur étant considéré parfois comme plus important que les gradients thermiques ou olfactifs (Tosi *et al.* 1990).

Des études expérimentales ont également mis en évidence que les anguilles sont capables de s'orienter en fonction du champ magnétique et d'enregistrer la direction de leur mouvement (Durif *et al.* 2013; Tesch 1974). Cette capacité serait peut être utile quand les voies de migration de retour sont bloquées, mais il n'est pas clair si le champ magnétique est utilisé et quelle serait son importance lors de la migration de montaison.

2.3 Génétique et plasticité phénotypique de l'anguille Européenne

Le statut de l'anguille européenne en tant qu'une seule et même espèce n'a pas toujours été clair. Les anguilles européennes ont tout d'abord été considérées comme une descendance de l'anguille américaine, qui aurait été soumise à la sélection écophénotypique pendant la grande traversée de l'Atlantique (Tucker 1959). Aujourd'hui, les anguilles européenne et américaine sont deux espèces à part entière, considérées comme fruits de la spéciation datant de 3 millions d'années, toutes deux issues de l'anguille japonaise *Anguilla japonica* (Lin *et al.* 2001). Le sujet de débat actuel ne concerne plus le cadre systématique de l'anguille européenne mais plutôt sa structure génétique. La panmixie, due au brassage total

du pool génétique par reproduction aléatoire des individus et à la dispersion aléatoire des larves a été remise en cause à plusieurs reprises et ceci pour les deux espèces. La variation géographique de la composition génétique a été proposée, mais cette hypothèse souffre d'une forte instabilité temporelle de la structure (Dannewitz *et al.* 2005; Pujolar *et al.* 2005). La dispersion des larves, considérée comme aléatoire, a également été questionnée. En effet, une tendance pour la répartition géographique a été trouvée chez la forme hybride entre l'anguille européenne et américaine, qui est principalement trouvée en Islande (Pujolar *et al.* 2014a). Par assurer une panmixie, le mode de reproduction des anguilles doit permettre un mélange parfaitement aléatoire des allèles. Cependant, une version « non aléatoire » a été aussi suggérée, où les femelles philopatriques restent fideles au site, et les mâles assurent un flux génique (Baltazar-Soares *et al.* 2014). Il y a aujourd'hui un consensus général sur le statut panmictique de l'anguille européenne (Als *et al.* 2011), car il ne rentre pas en conflit avec les patterns génétiques spatiaux (Daemen *et al.* 2001; Maes *et al.* 2006; Maes & Volckaert 2002; Pujolar *et al.* 2006; Wirth & Bernatchez 2001) ou temporels (Maes *et al.* 2009; Pujolar *et al.* 2009) retrouvés par différents auteurs. En effet, même si une sélection spatiale peut avoir lieu, elle n'aboutira jamais à une adaptation locale de l'espèce (Gagnaire *et al.* 2012; Pujolar *et al.* 2014b), car toute rupture des proportions alléliques à une génération donnée reviendra à l'équilibre lors de la reproduction suivante. L'étude de la structure de la population a également été abordée sous un angle transcriptomique. Une des questions les plus intéressantes concerne la capacité de l'anguille à survivre dans les conditions extrêmement différentes (p.ex. Maroc vs. Norvège) sans que l'adaptation locale soit nécessaire (Maes & Volckaert 2007).

Bien que les séquences génétiques restent relativement homogènes entre les individus des habitats extrêmes, les traits phénotypiques peuvent fortement varier et ceci en fonction des conditions environnementales ou du statut ontogénétique de l'individu. Ce phénomène est connu sous le nom de plasticité phénotypique, c'est-à-dire la capacité d'un génotype donné à produire des phénotypes différents sous l'effet de l'interaction avec l'environnement (Pigliucci 2001). Il est important de remarquer que le terme « phénotype » se réfère à une forme d'expression comprise dans la norme de réaction (Dingemans *et al.* 2010) du génotype, et l'interaction de ce dernier peut se faire avec l'environnement interne ou externe. Ainsi, on peut parler de la plasticité du phénotype moléculaire, cellulaire (p.ex. neuronal), comportemental, physiologique ou morphologique. Le terme « plasticité phénotypique » peut donc être utilisé sur toute l'échelle des niveaux de complexité de l'organisme. Il existe

différentes catégories de plasticité et l'utilisation du terme général peut parfois porter à confusion (Piersma & Drent 2003). Par exemple, la plasticité développementale est l'expression irréversible du phénotype (Figure 5), elle influence le phénotype d'un même individu en fonction de son stade ontogénétique et pourrait même jouer sur sa personnalité (Stamps & Groothuis 2010). La plasticité développementale est la plus étudiée et concerne les jeunes stades de vie de l'individu, la régulation de l'activité des gènes se fait chez tous les individus de la même espèce de manière peu variable. D'un autre côté, la flexibilité phénotypique est réversible, elle permet une variation interindividuelle et peut être exprimée à court terme. C'est cette dernière qui permet les processus d'acclimatation, c'est-à-dire les ajustements des traits physiologiques aux changements rapides des conditions environnementales (Piersma & Drent 2003).

Plasticity category	Phenotypic change is reversible	Variability occurs within a single individual	Phenotypic change is seasonally cyclic
Developmental plasticity	No	No	No
Polyphenism	No	No	Yes
Phenotypic flexibility	Yes	Yes	No
Life-cycle staging	Yes	Yes	Yes

Figure 5) Différentes catégories de la plasticité phénotypique (Piersma & Drent 2003). Les critères de différenciation concernent leur réversibilité, variabilité individuelle et leur fréquence cyclique.

La régulation différentielle de l'activité des gènes est l'un des mécanismes sous-jacents de la plasticité phénotypique, quel que soit son type (Oliveira 2012; Renn & Schumer 2013). Elle sera donc par définition dépendante du contexte environnemental ou du stade ontogénétique de l'individu. Ainsi, pour étudier la plasticité phénotypique des individus, on peut estimer la quantité d'ARN messager transcrit à partir des gènes sollicités. On parle alors de profils transcriptomiques qui, à la différence des profils génétiques fixes des individus, peuvent être variables dans le temps.

L'évolution et la plasticité phénotypique sont souvent considérées comme opposées, mais il existe des liens clairs entre la plasticité des traits soumis à la sélection et le potentiel évolutif d'une espèce. Bien que l'expression des gènes ait un coût (Smith & Chapman 2010; Wagner 2007), la plasticité phénotypique peut augmenter la valeur adaptative des individus. En effet, un certain niveau de plasticité serait essentiel pour qu'une population soumise à une fluctuation environnementale puisse persister (Price *et al.* 2003; Proulx & Smiley 2010; Roh

et al. 2013). Les traits phénotypiques présentant de la plasticité pourraient alors évoluer par le mécanisme d'assimilation génétique (Crispo 2007; Kopp & Matuszewski 2014). Par contre, un niveau de plasticité très grand pourrait, tout en assurant la persistance de la population dans de nouvelles conditions, réduire sa capacité à évoluer par spécialisation (Price *et al.* 2003). Enfin, dans la mesure où il existe une variance génétique de la plasticité phénotypique pour un caractère phénotypique donné, la plasticité phénotypique elle-même pourra évoluer pour ce caractère (Pigliucci 2001).

Il est généralement admis que la forte plasticité phénotypique de l'anguille européenne assure à l'espèce une colonisation très large des eaux continentales (Daverat *et al.* 2006a; Edeline 2007), permettant aux individus de développer une réponse rapide et efficace face aux changements brusques de l'environnement (Hutchings *et al.* 2007). L'anguille peut rapidement ajuster ses fonctions d'osmorégulation aux conditions physicochimiques du milieu (marin/eau douce) (Kalujnaia *et al.* 2007a), la morphologie de sa tête peut nous renseigner sur son régime (De Meyer *et al.* 2015; Ide *et al.* 2011), son taux de croissance possède une large gamme de réaction lui permettant d'acquérir des tailles à maturité très variables, que ce soit en fonction de l'environnement ou du sexe (Helfman *et al.* 1987). Ce dernier n'est pas défini à la naissance et semble d'ailleurs aussi dépendant des conditions environnementales, tels que la densité des congénères (Davey & Jellyman 2005; Krueger & Oliveira 1999). Du point de vue évolutif, la plasticité phénotypique de l'anguille est considérée comme adaptative (Lande 2009), en particulier dans le cas d'un brassage allélique aléatoire lors de la reproduction et de la dispersion aléatoire des larves empêchant les pressions de sélection locale d'aboutir à une adaptation spécifique de l'habitat (Gagnaire *et al.* 2012). Plusieurs études ont porté sur l'analyse du niveau d'expression des gènes en fonction des caractéristiques abiotiques de l'habitat (Kalujnaia *et al.* 2007b), du stade de développement de l'espèce (Bernatchez *et al.* 2011) ou de la variation géographique du milieu (Côté *et al.* 2009). Cependant, aucune étude n'a comparé les profils génétiques ou d'expression génétique en fonction du comportement des individus vis-à-vis de la migration de montaison active. En effet, là où l'influence de la marée dynamique s'arrête, les civelles doivent exprimer un comportement de nage à contre-courant pour progresser en amont du réseau hydrographique. Ce comportement n'est pas présent chez toutes les civelles, car une part de la cohorte se sédentarise dans les zones saumâtres du plateau continental ou tout le long de l'axe de migration. Ainsi, la distribution structurée des individus d'aval en amont de l'axe de migration pourrait potentiellement être liée à des traits génétiques ou phénotypiques eux-mêmes liés à la capacité ou à la volonté de

nage à contre-courant, ou encore au comportement d'escalade des obstacles qui fragmentent le milieu. Certains traits phénotypiques joueraient un rôle important dans l'expression du comportement de migration active, comme p.ex. les réserves énergétiques, le facteur de condition (Bureau du Colombier 2008; Bureau du Colombier *et al.* 2007; Edeline *et al.* 2006) et le taux circulant d'hormones thyroïdiennes (Edeline *et al.* 2005; Edeline *et al.* 2004). L'existence de tels profils génétiques ou d'expression génétique favorisant des valeurs particulières de ces traits a cependant été rarement évoquée, même si l'hypothèse de la sélection spatialement variable a été récemment avancée dans le cas de l'espèce proche, l'anguille américaine (Côté *et al.* 2014; Pavey *et al.* 2015).

2.4 Déclin de l'espèce

Une forte baisse d'abondance de l'anguille européenne a été observée depuis les trois dernières décennies. Cette baisse a été rapportée au niveau de l'abondance des leptocéphales à proximité des sites de reproduction de la mer de Sargasses (Als *et al.* 2011), du recrutement des civelles sur le continent, de la capture d'adultes par les pêcheurs professionnels (programme INDICANG). Il existerait plusieurs causes du déclin de l'espèce. Parmi elles, on peut citer la disparition de l'habitat, la surpêche, les pathologies, la pollution, le réchauffement climatique ou encore les entraves à la migration (fragmentation des cours d'eau).

Disparition de l'habitat

Le principal facteur d'altération du potentiel d'accueil de l'habitat est lié à l'assèchement des zones humides par les activités agricoles. On estime qu'il est à l'origine de la disparition de 50 % des habitats exploitables par l'anguille en Europe (Moriarty & Dekker 1997). Quand ce n'est pas l'assèchement total des zones ou la création de zones hypoxiques (dont le taux d'oxygène dissous dans l'eau est insuffisant pour la vie ou survie des organismes), il s'agit de la réduction des débits d'eau et donc de la baisse d'attractivité des sites pour les civelles en migration. Ainsi les zones idéales de croissance, même si disponibles, ne sont pas toujours atteintes.

La surpêche

La pêche de l'anguille concerne tous les stades : civelles (majoritairement sur la côte Atlantique française et espagnole), anguille jaune (pêcherie forte en Méditerranée) et anguille

argentée (principalement au nord de l'Europe et en Irlande). Les captures de civelles sont réalisées par des pêcheurs professionnels, tandis que pour le stade de l'anguille jaune, on peut observer des captures liées à la pêche récréative. Bien que les pêcheries professionnelles soient soumises à des quotas stricts, il existe toujours une forte pêche illégale, motivée par le prix très élevé des civelles.

Les pathologies

Parmi les facteurs affectant l'état sanitaire des anguilles, on peut citer tout d'abord le nématode *Anguillicola crassus*, qui s'est répandu dans les années 80 à partir de cargaisons d'*Anguilla japonica* destinées à l'aquaculture allemande. Ce parasite présente un fort taux d'infestation (50%-60% en 2002) et réduirait la capacité de nage en profondeur des anguilles adultes, nécessaire lors de la migration de reproduction (Kirk 2003). Un autre parasite est le protozoaire *Ichthyophthirius multifiliis* responsable de la maladie d'ichtyophthiriose (maladie des points blancs), qui n'est pas directement mortel, mais provoque un stress physiologique chez les individus les rendant sensibles à tout autre stress (Münderle *et al.* 2004; Ventura & Paperna 1985). On peut également noter les infestations par les micro- ou myxosporidies (p.e. *Myxidium giardi*) qui provoquent l'apparition de kystes branchiaux ou sur les organes internes, ce qui causerait par la suite des retards de croissance ainsi que des gênes respiratoires. Il existe également des maladies virales, tels que celle liées au virus EVEX, provoquant l'anémie et d'importantes hémorragies chez les anguilles (Van Ginneken *et al.* 2005). L'impact des pathologies est particulièrement fort dans les zones de forte condensation des individus (p.ex. au pied des barrages).

La pollution aquatique

Plusieurs caractéristiques biologiques de l'anguille tels que sa longue phase de croissance dans les milieux continentaux, son régime alimentaire varié et carnivore (carnassier opportuniste), ainsi que son mode de vie benthique et sa forte teneur en lipides nécessaire à la migration de reproduction font d'elle une espèce particulièrement exposée et sensible à la pollution. On classe les pollutions selon la nature des contaminants. Ainsi, on distingue les pollutions organiques (hydrocarbures, engrais, pesticides etc) ou métalliques (p.ex. métaux lourds). La contamination des écosystèmes aquatiques par des polluants est liée, entre autres, à l'intensification de l'agriculture et l'utilisation massive des produits phytosanitaires dans les zones proches des plans d'eau (Adam *et al.* 2008). Le principal danger vient du phénomène de bioamplification de certains éléments toxiques, car l'anguille

se trouve au sommet de la chaîne alimentaire (Bach *et al.* 2007). Parmi ces polluants organiques, les polychlorobiphényles (PCBs) méritent une attention particulière (Bodin *et al.* 2014; Tapie *et al.* 2011). En ce qui concerne les contaminants métalliques, on peut mentionner le mercure avec ses effets neurotoxiques et le cadmium, qui perturbe le développement des gonades, le stockage des lipides et la phase de vitellogénèse chez l'anguille (Pierron *et al.* 2007; Pierron *et al.* 2008).

Changement climatique et variations océaniques

Les changements climatiques peuvent avoir un impact sur les flux de masses d'eaux telles que le courant océanique du Gulf Stream. Ce dernier est souvent mentionné comme étant le principal convoyeur des larves leptocéphales, assurant le transport passif de ces dernières vers les côtes européennes (Bonhommeau *et al.* 2009; Durif *et al.* 2011; Knights 2003; Munk *et al.* 2010). De même, toute variation des conditions environnementales rencontrées pendant la migration ou reproduction peut avoir un effet non négligeable sur le recrutement des poissons marins. Par exemple, la diminution des débits des rivières pourrait réduire l'attractivité des zones amont lors de la montaison des civelles. Un phénomène largement étudié est l'Oscillation Nord Atlantique (NAO), souvent associé à la fluctuation d'abondance de l'anguille (Arribas *et al.* 2012; Kettle *et al.* 2008) et des espèces marines d'une manière générale (Stenseth *et al.* 2002).

Les obstacles à la migration

Les dispositifs de régulation des débits d'eau tels que les barrages, les seuils ou les portes à flots empêchent les civelles/anguillettes d'atteindre les zones de croissance optimale, et perturbent la migration de reproduction des individus adultes. Les obstacles aquatiques étant le sujet de ce projet de thèse, leur impact sera décrit en détail dans la prochaine section du chapitre.

3. Obstacles aquatiques et leur impact

3.1 Description des obstacles

Par définition, l'obstacle aquatique représente une entrave à la libre circulation de l'eau et/ou des organismes aquatiques. Ils peuvent être d'origine naturelle (cascades) ou anthropique. Les obstacles d'origine anthropique les plus étudiés concernent les imposants

barrages aquatiques (p.ex. les barrages hydroélectriques), leur construction étant souvent médiatisée et soumise à des expertises scientifiques strictes. Mais il existe également des obstacles de petite taille (seuils, moulins), bien plus nombreux mais ayant reçu beaucoup moins d'attention (Figure 6).

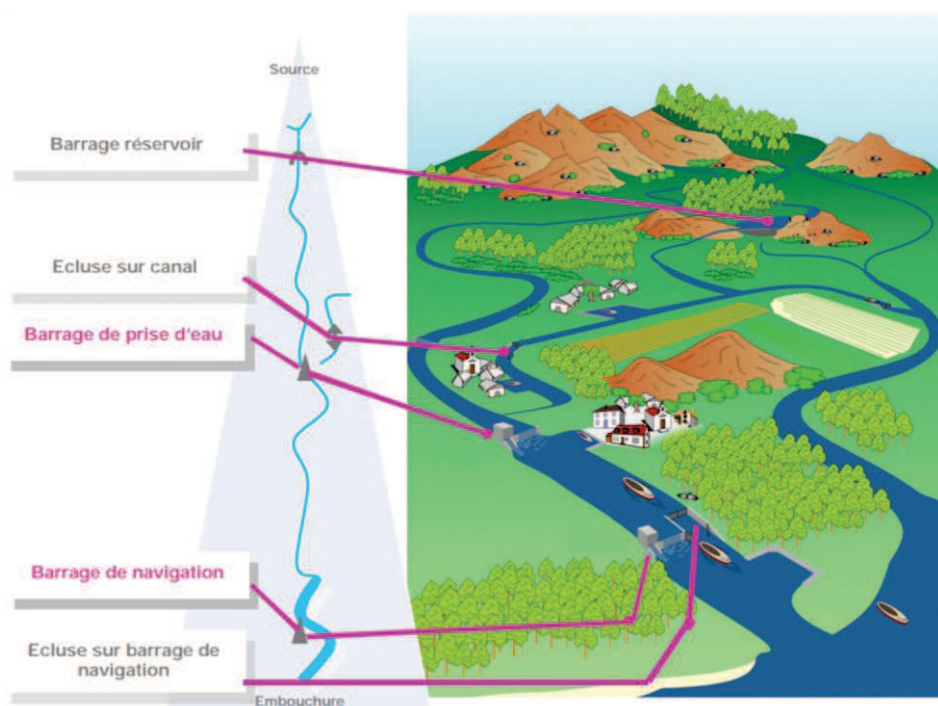


Figure 6) Exemples d'aménagements d'origine anthropique, implantés sur le même cours d'eau. Ici, pour passer de l'embouchure jusqu'au réservoir d'eau, les poissons doivent faire face aux quatre obstacles (Aigoui & Dufour 2008).

En France, comme dans de nombreux pays européens, les seuils et barrages en rivière se comptent par dizaines de milliers, la plupart d'entre eux étant installés sur des cours d'eau à poissons migrateurs. A titre d'exemple, dans les provinces du nord de l'Espagne, la densité moyenne des obstacles en rivière d'origine anthropique est de 0.46 obstacles/km (Garcia De Leaniz 2008). Les premières réalisations en Europe remontent au Moyen Age. Elles se sont ensuite largement multipliées. La France comptait environ 100 000 moulins hydrauliques au début du XIXe siècle (Dambrine 2006), associés à des activités de meuneries, forges, flottage, pisciculture et irrigation. Au XXe siècle, ces usages initiaux ont été pour la plupart abandonnés et les nouvelles réalisations sont destinées à la stabilisation du lit des cours d'eau suite à l'augmentation des prélèvements de granulats en lit mineur, à l'irrigation, à la navigation, à l'alimentation en eau des agglomérations, au tourisme, à la protection contre les crues et surtout à la production hydroélectrique. Aujourd'hui, plus de 2000 centrales hydroélectriques sont recensées en France (Croze & Larinier 2007).

3.2 Multitude d'impact des barrages

Plus d'un tiers des poissons européens vivant en eau douce sont touchés par la fragmentation des axes aquatiques du fait de l'activité humaine; l'impact lié aux barrages aquatiques figure parmi les facteurs principaux dans 40% des cas (Northcote & Lobón-Cervía 2008). Cet impact est également considérable sur d'autres continents (Lucas & Baras 2001). Les espèces à fort potentiel dispersif (Pépino *et al.* 2012) ou les espèces migratrices diadromes sont parmi les plus touchées (McDowall 1988). En effet, de nombreux bassins sont rendus inaccessibles aux poissons migrateurs suite à la construction d'obstacles sur leurs axes migratoires (Larinier 2001; Nicola *et al.* 1996). En France, l'installation de seuils et barrages sur les cours d'eau ou sur les estuaires s'est pratiquement toujours traduite par la raréfaction, voire la disparition des espèces de poissons migrateurs et peut être considérée comme l'une des causes essentielles de la diminution de l'aire de répartition de l'anguille et du saumon (Larinier 2001). Ces ouvrages exercent en effet des impacts multiples sur la faune piscicole, non seulement en limitant ou interdisant la libre circulation amont-aval, mais aussi en modifiant les propriétés physico-chimiques de l'habitat des poissons (Croze & Larinier 2007). Naturellement, la rivière est parsemée des microhabitats hétérogènes, permettant la création des niches écologiques diverses et ainsi maintenant un potentiel d'accueil important vis-à-vis de la biodiversité aquatiques. La fragmentation des axes aquatiques par des ouvrages de grande taille comme les barrages des centrales hydroélectriques peut aboutir à la création de deux habitats amont/aval aux conditions « extrêmes ».. mais à des conditions homogènes à l'échelle intra-site, pas nécessairement propices à une forte biodiversité locale.

On note une sédimentation plus forte, une augmentation de la profondeur et de la température, ainsi qu'une diminution de l'oxygène dissous dans l'eau des parties situées en amont des obstacles. Les conditions en amont deviennent plus proches de celles rencontrées dans des milieux lacustres, plus favorables aux poissons à mode de vie benthique. On observe généralement le contraire dans les parties aval, où la courantologie est plus forte et, étant gérée par l'homme, peut subir des variations temporelles asynchrones avec les variations saisonnières, auxquelles le cycle de vie des organismes aquatiques était adapté (p.ex. dissolutions des œufs, accès aux sites de reproduction en amont).

3.3 Réduction de la libre circulation

a) Réduction du flux génique

La fragmentation de l'habitat peut avoir des conséquences importantes sur la structure génétique d'une population parce que les barrières physiques peuvent, dans les cas d'une espèce capable de se reproduire aussi bien en amont et qu'en aval de l'obstacle, entraver le flux génique entre les deux subpopulations. Les populations bloquées par les obstacles accueillent moins de migrants que d'autres populations, ce qui réduit le flux de gènes et accroît le danger de consanguinité. D'une manière générale, si la fragmentation produit une réduction du nombre de géniteurs cela entraîne une diminution de l'hétérozygotie (H) et de la fréquence d'allèles (Na). Si la fragmentation concerne des populations de petite taille initiale, le risque d'extinction devient important. Dans le cas de populations de grande taille effective, la fragmentation peut conduire à une baisse de la diversité génétique engendrée par l'effet fondateur mais aussi en raison de la dérive génétique. Dans le cas des espèces inaptes à la reproduction de deux côtés de l'obstacle, on peut observer un phénomène de piège évolutif. Dans les cas de l'anguille par exemple, effectuant sa reproduction uniquement en milieu océanique (= en aval de l'obstacle), le pool génique des individus bloqués en amont sera perdu.

b) Migrateurs : réduction d'accès aux habitats essentiels

Dans le cas des espèces diadromes, les obstacles aquatiques limitent l'accès aux zones essentielles pour accomplir leur cycle de vie. L'habitat amont constitue le site de frayère pour le saumon, alors que les juvéniles d'anguille s'y rendent pour y effectuer leur phase de croissance somatique.

Dans le cas de l'anguille, l'enjeu est double. Les obstacles empêchent les civelles/anguillettes d'accéder aux habitats de croissance en amont, mais entraînent aussi une mortalité accrue lors de la dévalaison des anguilles argentées. En effet, la migration de reproduction nécessite à nouveau un passage par les barrages, mais cette fois il s'agit des individus de grande taille qui, dans le cas des centrales hydroélectriques, sont attirés dans les zones où le fort débit d'eau passe par les hélices des turbines génératrices d'énergie. De nombreuses études et simulations portent sur le taux de mortalité des anguilles en fonction de

la taille de leur corps et du type de turbine utilisé (Gomes & Larinier 2008; Larinier & Dartiguelongue 1989).

Les impacts indirects de cette connectivité restreinte entre les habitats de croissance et de reproduction concernent le retard dans la migration et l'accumulation des individus au pied des obstacles. Le retard à la migration est souvent lié au temps nécessaire pour franchir un obstacle, ou, dans le cas des obstacles équipés des dispositifs de franchissement, à la difficulté de trouver l'entrée du dispositif, au mauvais positionnement de la passe ou encore à la faible attractivité de celle-ci. Dans tous les cas, quel que soit le type d'obstacle ou sa franchissabilité, son passage entrainera toujours un certain retard dans la migration des individus par rapport au temps du passage dans un axe libre d'obstacles. Dans certains cas, ce délai temporel peut être crucial pour l'individu, car il risque d'atteindre la zone de frayère en dehors de la fenêtre de reproduction optimale. Ce délai peut également entrainer une diminution trop importante des réserves énergétiques stockées et non renouvelables et ainsi compromettre l'accès des individus aux zones de fraie.

Les seuils et barrages peuvent également avoir un impact néfaste sur les individus en montaison en concentrant les poissons à leur pied ce qui exacerbe leur vulnérabilité aux prédateurs. L'aval de barrages constitue également un lieu privilégié pour le braconnage. Chez l'anguille, la forte densité au pied du barrages aurait d'autres impacts indirects ; la transmission des maladies serait facilitée, et le sex-ratio, souvent considéré comme dépendant de la densité, serait modulé en faveur des mâles (Davey & Jellyman 2005).

4. Passes à poissons

Aujourd'hui, pour protéger l'environnement de l'impact potentiel des barrages et assurer son implantation de manière optimale, tout nouveau projet d'aménagement doit être accompagné d'études évaluant les contraintes fonctionnelles et structurelles qu'il est susceptible de rencontrer ou de créer à l'environnement. Parmi les contraintes structurelles, on peut citer des études de topographie et bathymétrie du site, de la nature des sols et de ses caractéristiques mécaniques, et une étude d'équipements et réseaux implantées dans le futur aménagement. Concernant les contraintes fonctionnelles, une étude d'hydrologie doit rendre compte de l'importance d'un transport solide (sédiments), du transport des flottants (embâcles) et estimer les débits caractéristiques des cours d'eau, alors qu'une étude hydraulique doit rendre compte de la répartition des écoulements et des niveaux d'eau en

amont et en aval du futur ouvrage, et de l'évolution de la hauteur d'eau en fonction du débit du cours d'eau. Une dernière contrainte fonctionnelle concerne la franchissabilité piscicole. En effet, il est obligatoire d'évaluer les possibilités de franchissement de l'obstacle par les espèces susceptibles d'emprunter le corridor fragmenté, et de caractériser la dynamique temporelle de cette franchissabilité (permanente, temporelle) aussi bien pour la montaison que la dévalaison. Dans de nombreux cas, les dispositifs de franchissement de l'obstacle seront proposés, afin d'augmenter la transparence de l'ouvrage et donc de diminuer l'impact fonctionnel de celui-ci.

4.1 Généralités

La prise de conscience de l'impact des barrages sur la connectivité écologique a poussé les gestionnaires à construire des dispositifs de franchissement. En France, les premiers efforts en vue de faciliter le passage des poissons ont été mentionnés au 17^e siècle, où des tas de branches d'arbres ont été placés sur les zones à fort dénivelé, afin de « casser » le courant et créer des zones de repos dans les endroits où le poisson est exposé à la forte courantométrie. Aujourd'hui, il existe une gamme très large de dispositifs de passage, dont le design répond aux caractéristiques de l'environnement, au type d'obstacle aménagé, mais aussi à la biologie de l'espèce visée, repartis sur toute la France (Travade 2005) (Figure 7).

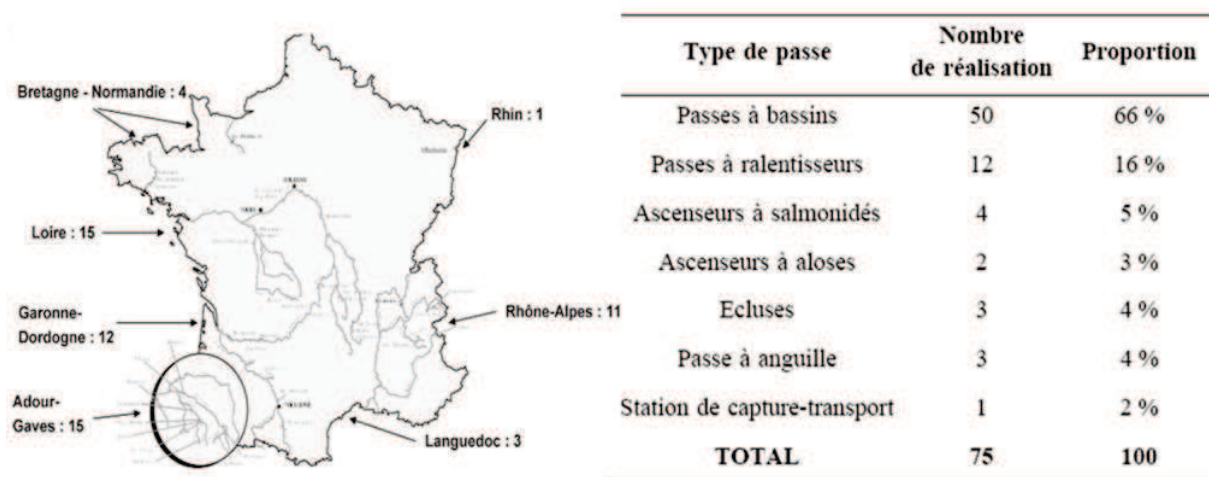


Figure 7) Répartition géographique des passes et nombre par type des passes construites sur les barrages EDF de 1984 à 2004 en France (Travade 2005).

En effet, il est généralement difficile de construire un dispositif ‘multi-espèce’. Le comportement de chaque espèce, son habitat préférentiel ainsi que ses capacités de nage doivent toujours être prises en compte. Les poissons migrateurs en constituent un bel exemple. Face à l’obstacle, les salmonidés effectueront préférentiellement des sauts en dehors de l’eau, alors que les anguilles et lamproies chercheront à escalader les parois humides (Foulds & Lucas 2013; Katopodis 2005; Williams *et al.* 2012). L’emplacement du dispositif dépendra également de l’habitat préférentiel du poisson et de ses capacités de nage. D’une manière générale, il existe deux principes de fonctionnement des dispositifs de passage (Travade 2005). Soit il s’agit d’ouvrir une voie d’eau permettant de contourner les barrages (passe à poissons), soit piéger les poissons avant de les transporter et de les déverser en amont de l’ouvrage (ascenseur à poisson) (Figure 8). La plupart des passes fractionnent l’obstacle infranchissable en éléments compatibles avec les capacités de nage de l’espèce visée, alors que l’ascenseur à poisson repose sur le principe d’assistance au franchissement de l’obstacle. Quelque soit le dispositif concerné, il doit répondre à quelques critères généraux. Il devrait permettre le passage de tous les individus de l’espèce visée, assurer le passage dans les meilleures conditions possibles (sans stress ni blessure), il doit être suffisamment attractif et accessible pour que le poisson puisse rapidement explorer l’entrée du dispositif sans que cela génère un retard important dans sa migration, et il doit être également construit de manière à minimiser les efforts d’entretien, de maintenance et de réglage. On peut classer les passes dans 5 grands groupes : les passes à bassins ou pré-barrages, les passes à ralentisseurs, les passes « naturelles », les ascenseurs (ou écluses) et les passes à anguilles. Il existe également des passes « mixtes », dont l’architecture se base sur deux groupes structurels de passes, de manière à multiplier les modes de communication et combiner les avantages de chacun.

Il existe de nombreux outils d’aide à la conception d’une passe spécifique à l’espèce et au contexte environnemental (Alvarez-Vazquez *et al.* 2011; Larinier 1987) . Pour estimer la qualité d’une passe, on se basera sur son « attractivité » (Bunt 2001), « accessibilité » et « efficacité » (Katopodis 2005; Steffensen *et al.* 2013; Williams *et al.* 2012). Une passe doit créer des conditions percevables et attirantes pour les individus de l’espèce visée. Dans la majorité des cas, il s’agit d’un débit d’eau sortant plus fort qu’à proximité directe du pied de la passe. La partie aval de la passe doit être également facile d’accès. Les individus guidés par des stimuli provenant du dispositif, doivent pouvoir rapidement s’engager dans la passe. Une attente aurait pour effet de retarder la migration ou d’accroître le risque de prédation, les prédateurs ayant repéré les zones d’accumulation des individus. L’efficacité de la passe est

généralement estimée soit au niveau populationnel, en estimant la proportion des individus ayant réussi le passage du dispositif par rapport à ceux présents au pied de la passe (Castro-Santos 2004; Castro-Santos & Haro 2003; Roscoe & Hinch 2010), soit au niveau populationnel ou individuel, en déterminant la proportion des passages réussis par rapport à la fréquence des tentatives, cette dernière étant liée directement à l'attractivité de la passe (Castro-Santos 2004). Dans les deux cas, la structure de la passe doit permettre à l'individu le passage sans effort et sans stress (Katopodis 2005). En effet, certaines études ont mis en évidence un effort physiologique important voire excessif lors de la traversée des passes (Burnett *et al.* 2014; Silva *et al.* 2015), qui mène parfois à la mort des individus (Hinch & Bratty 2000; Pon *et al.* 2012). D'une manière générale, l'efficacité d'une passe serait inversement liée à son attractivité (Bunt *et al.* 2012). Par exemple, les passes naturelles génèrent une pente faible, facile à passer, mais la faible vitesse et débit du courant n'attirent pas les poissons. Compte tenu de la grande diversité fonctionnelle et structurelle des dispositifs de passage, une description complète sera faite uniquement sur les dispositifs spécifiques au passage de la civelle, car seul ce type de passe a fait l'objet d'études au cours de cette thèse.

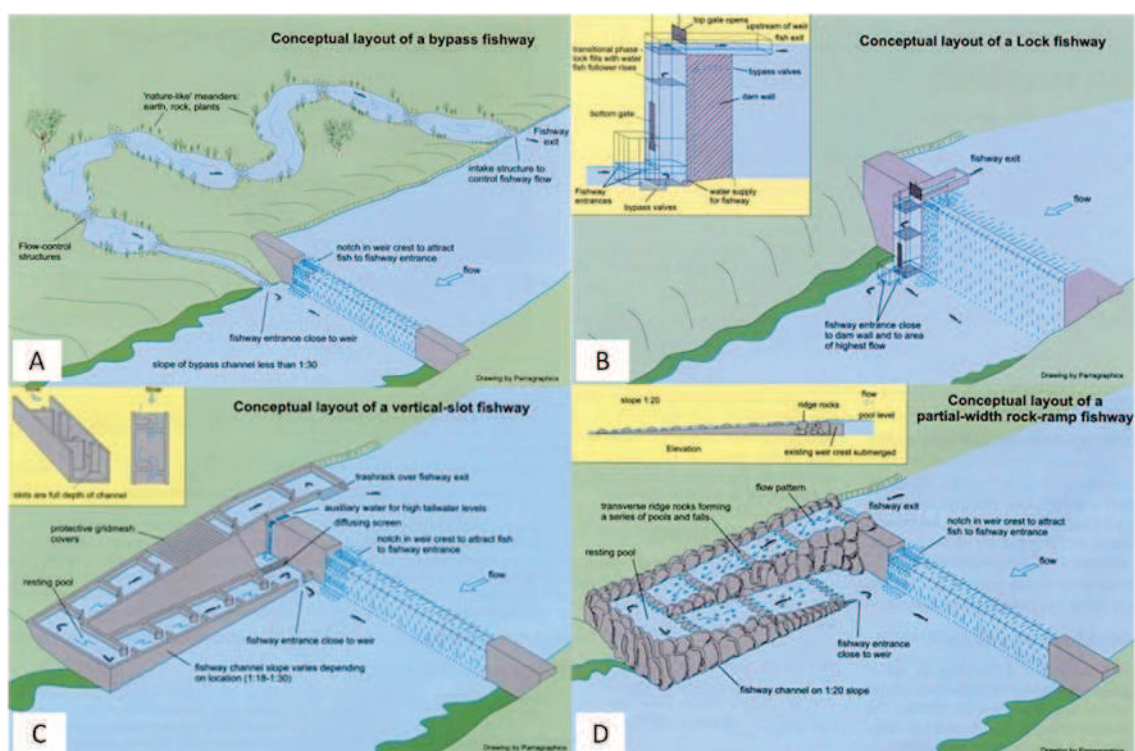


Figure 8) Quatre exemples des dispositifs de passage à poissons : aménagements « naturels » (A), ascenseurs (B), passes à ralentisseurs (C) ou à bassins successifs (D). Source : <http://www.dpi.nsw.gov.au/fisheries/habitat/rehabilitating/fishways>

4.2 Passes à anguilles

Des dispositifs visant à améliorer le franchissement des barrages par les anguilles doivent prendre en compte le stade de l'espèce concernée. En effet, si pour le stade adulte on pourrait adapter certains types de passes multi-espèces (en réduisant par exemple la hauteur de chute entre les bassins ou ajoutant de la rugosité de fond), pour les jeunes stades d'anguille (civelle et anguillette) on favorisera un aménagement spécifique basé sur les capacités d'escalade des individus. Bien que les anguilles de petite taille ne possèdent pas de fortes capacités de nage, elles sont dotées d'une bonne capacité de reptation sur des parois rugueuses et humides, ce qui leur permet de contourner les zones à fort courant et de franchir des obstacles de faible hauteur. Ainsi, les dispositifs de passe des individus de petite taille devraient être placés préférentiellement en aval des axes. Les passes à civelles sont composées de deux parties. La partie principale concerne une rampe de montée revêtue d'un matériau permettant à l'individu des mouvements sinusoïdaux tout en assurant une bonne accroche au substrat continuellement humide. La pente de la rampe se situe généralement autour de 45°-50° et peut dépendre de la longueur totale du dispositif. La partie inférieure de la rampe est immergée dans une zone facile d'accès (faible courantométrie, si possible à proximité des endroits confinés ou pourvu d'abris pour limiter la prédation). La partie amont de la passe est pourvue généralement d'un bac de récupération ou vivier, où les civelles sont piégées puis relâchées plus loin en amont. Parfois le bac de récupération n'est pas nécessaire, la configuration de la passe permettant l'accès au plan d'eau amont où les vitesses d'écoulement sont suffisamment faibles pour éviter le rejet des individus directement vers l'aval. Il est impératif d'appliquer un débit d'eau sur la rampe (par arrosage ou gravitation), permettant le maintien d'une humidité permanente du substrat (éviter l'assèchement du corps) et une meilleure accroche (interaction entre l'eau et le mucus) des civelles. Le débit d'eau doit être suffisant pour être détecté et pour attirer les civelles situées en aval, sans pour autant être une contrainte hydrologique lors de l'escalade.

Deux types de revêtement de rampe sont utilisés en France, le tapis artificiel ou les plots en béton (Figure 9). Le tapis artificiel est constitué des picots ou des faisceaux de soie et ressemble visuellement à des tapis de gazon artificiel. L'espacement des faisceaux de soie dépend de la taille de la civelle/ anguillette visée et varie généralement entre 7 et 14 mm. Le deuxième type de revêtement est composé des dalles de béton recouvertes par des rugosités généralement cylindriques. Ici, l'écartement des plots est plus grand (30-40mm) et est utilisé

lorsque les individus visés sont au stade anguilette/petite anguille jaune. En effet, la rugosité de substrat dans les deux cas doit permettre à l'individu d'avoir à tout moment d'escalade plusieurs points d'accroche. Ainsi, cette multitude de points d'accroche permet à l'individu de se reposer mais aussi d'avoir un appui assuré sur une grande surface et sur différentes angles afin de permettre un nouveau mouvement d'escalade.

Toute la partie aérienne du dispositif est généralement couverte pour éviter l'ensoleillement trop fort et protégée par une structure métallique pour éviter la prédation aviaire.

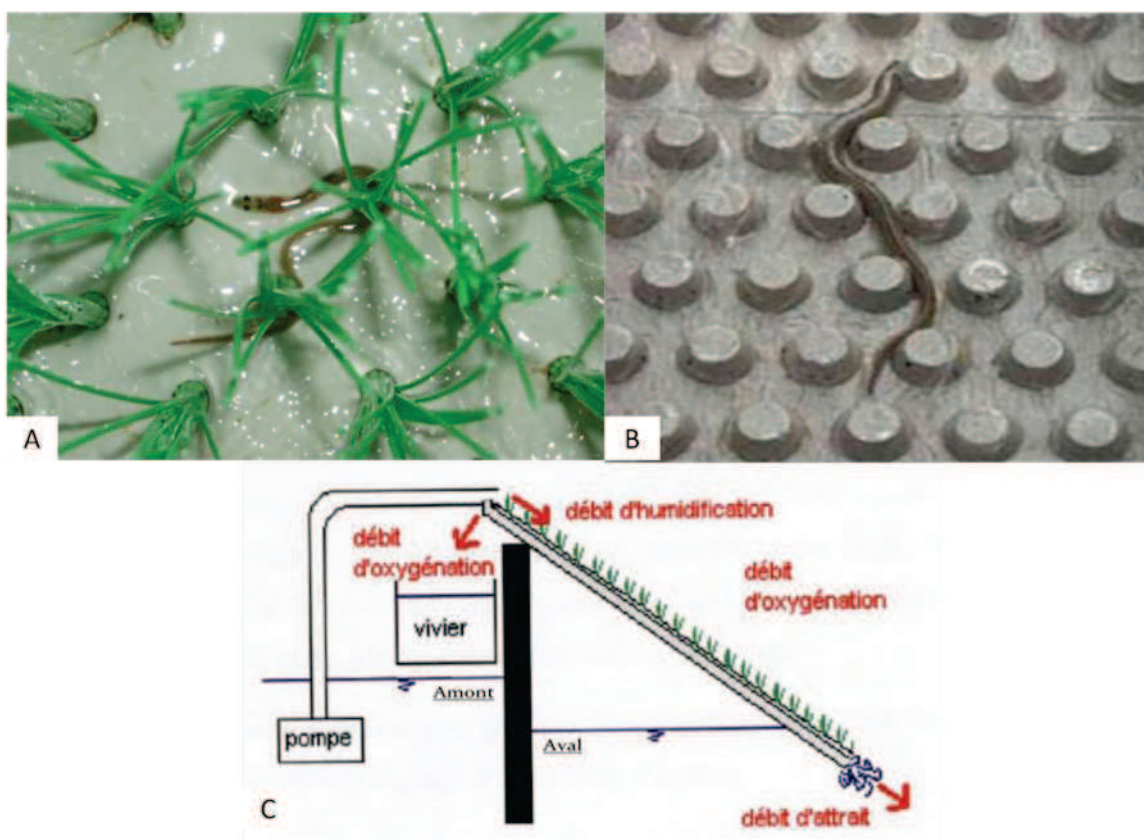


Figure 9). Deux types de substrat utilisé pour les échelles à anguilles (tapis artificiel (A), plots cylindriques (B)) et le schéma du dispositif entier. Source : (Aigoui & Dufour 2008).

CHAPITRE 2 :

Méthodologie

1. Site d'étude

Les sites d'échantillonnage ont été choisis selon les critères permettant la réalisation de l'étude et une interprétation rigoureuse des résultats acquis. Les principaux critères de choix de l'axe aquatique concernaient la faible distance entre les sites et la limite océanique (présence de jeunes stades d'anguille) et la station expérimentale d'Irstea (possibilité de transport rapide des individus vivants), son accessibilité, le faible éloignement entre les obstacles successifs, les conditions physico-chimiques relativement homogènes entre les sites et la présence de différents types des passes à anguilles. L'axe du Canal du Porge, situé à 50 km de l'institut Irstea Bordeaux, et à 110 km de la station d'expérimentation, fut retenu (Figure 10).

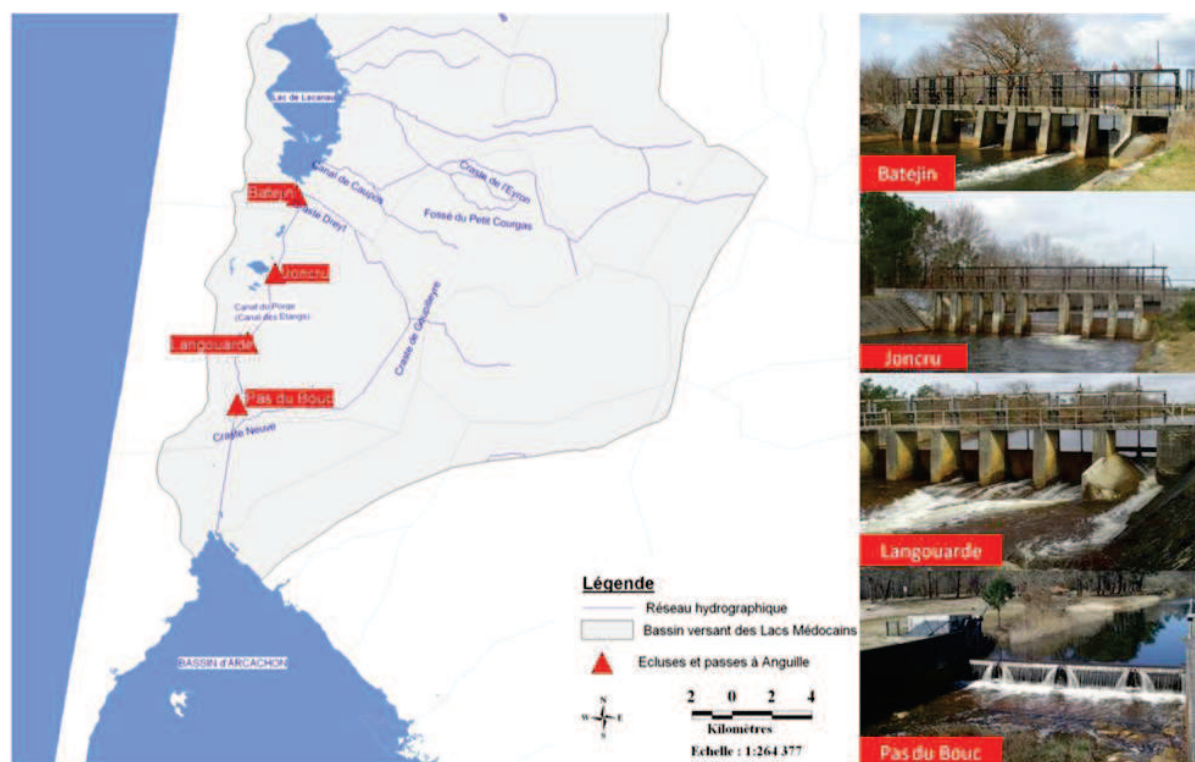


Figure 10) Sites d'échantillonnage sur le Cana du Porge (Photos :©FDAAPPMA 33)

Le Canal du Porge est un axe reliant le lac Lacanau au Bassin d’Arcachon. Il est considéré comme la partie du sud du Canal des Etangs, qui lui assure la liaison entre le lac de Carcans-Hourtin (le plus grand lac littoral d’Europe) et le lac Lacanau. Le canal du Porge se jette dans le Bassin d’Arcachon au niveau de Lège-Cap-Ferret (près de 6 km en aval), à environ 15 km de l’océan. Le canal du Porge mesure 18,5 km et, avec les 7,5 km du Canal des étangs, il représente un réseau de 500 km de crastes et tributaires des lacs. Le Canal du Porge est un axe d’origine anthropique, d’une vitesse de courant moyenne de 0,5 m/s (réduite en période estivale), d’une largeur de 35 mètres et présentant des conditions abiotiques relativement stables sur toute sa longueur. Il est peuplé par une dizaine d’espèces piscicoles et deux espèces de crustacés, cette communauté étant représentée principalement par l’anguille Européenne, la perche soleil, l’écrevisse de Louisiane et l’écrevisse signal. L’axe du Canal du Porge est divisé par 4 écluses successives, construites à la fin du XIX^{ème} siècle, dans le but de maintenir les eaux des lacs à un niveau stable et de gérer au mieux les activités et usages de l’époque, notamment le transport de bois.

L’écluse du Pas du Bouc constitue la première entrave à la migration amont des civelles et est donc la « porte d’entrée » des lacs et marais médocains pour cette espèce. Elle est située à environ 6 km de la limite du Bassin d’Arcachon. Cet obstacle a été équipé en 2007 d’un dispositif de passage pour les civelles. La passe à civelles a été implantée sur rive droite du Canal, sous un abri sécurisé, et est constitué d’une rampe de 4.30 m de long, inclinée à 45° (Figure 11). Le substrat de la rampe de reptation est un tapis artificiel Fishpass® constitué de faisceaux de soies en plastique. La rampe est alimentée par une goulotte distribuant de l’eau sur la rampe et dans le bac de stabulation/piégeage. Le volume de 450 L du bac de piégeage et de stabulation des anguilles permet un bon renouvellement ainsi qu’une bonne oxygénation de l’eau. Un système de vannes permet de garder un niveau constant d’eau dans le bac (évacuation du trop-plein), mais également de diminuer le niveau d’eau lors de la récupération des individus piégés. Une grille fine présentant une maille de 1mm est installée dans le fond du bac et scellée avec des joints silicone pour empêcher la fuite des civelles dans la canalisation de sortie de l’eau. La passe du Pas du Bouc est entretenue et visitée régulièrement par la Fédération de Pêche de Gironde, qui assure un suivi de la migration sur toute la zone du Canal de Etangs.

Les écluses de la Langouarde, du Joncru et du Batejin, situées respectivement à 2,5/6/8,5 km à l’amont de l’écluse du Pas du Bouc possèdent une structure similaire, le corpus de l’obstacle étant une dalle métallique verticale de 3 mètres de hauteur (Figure 10). Seule la

profondeur en aval de l'obstacle peut différer entre les écluses. Sur le site de la Langouarde, tout comme sur le site du Pas du Bouc, la profondeur au pied de l'obstacle reste faible (<1m) et permet l'usage du matériel de pêche électrique. Sur les sites de Joncru et Batejin, la profondeur au pied de l'obstacle est d'environ 3 mètres et la prospection par pêche électrique n'est pas possible. Les trois obstacles sont équipés du même type de dispositif de passage, sous forme d'une dalle en béton recouverte par des plots cylindriques.

Toutes les études effectuées durant cette thèse portaient sur cet axe, l'échantillonnage fut réalisé à la fin de la période de migration estivale (début juin –fin juillet) sur trois années consécutives et la capture fût réalisée par pêche électrique ou par récupération directe des individus escaladant ou piégés (au niveau de la passe du Pas du Bouc).

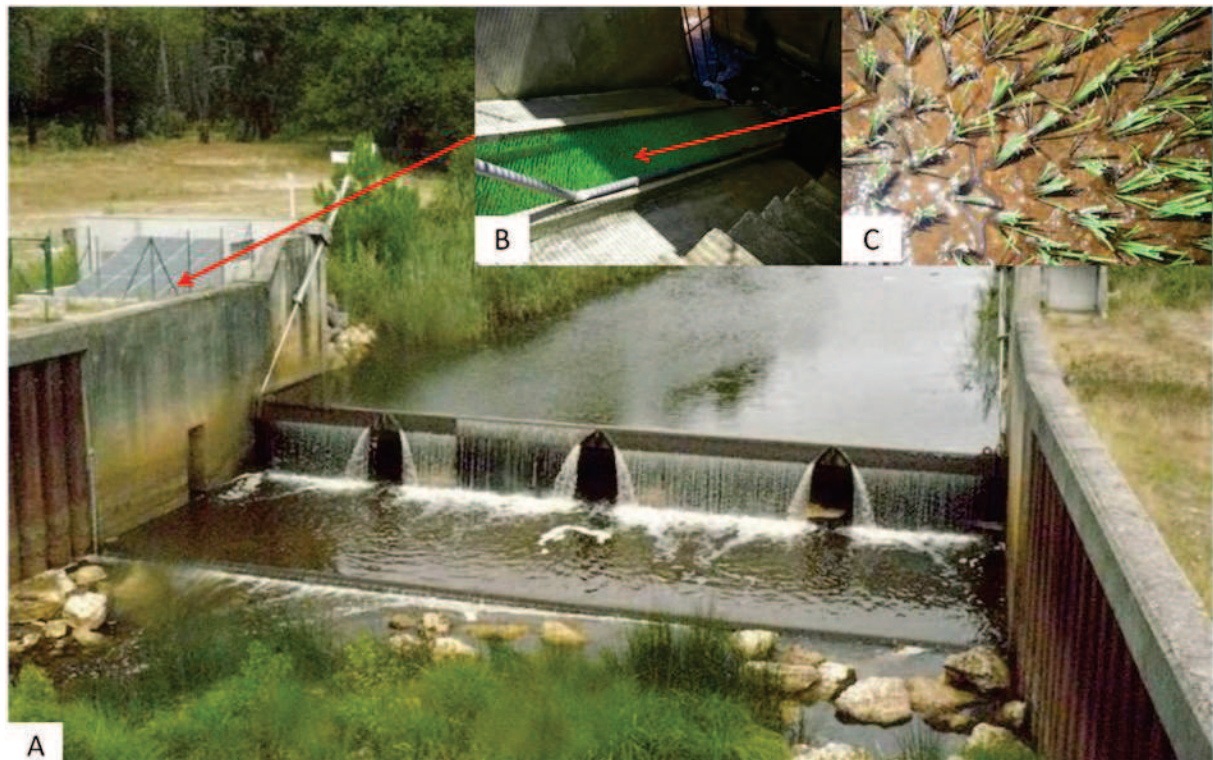


Figure 11) Ecluse du Pas du Bouc (A), avec son échelle à civelles (B) et le substrat utilisé (C) (©FDAAPPMA 33).



Figure 12) L'exemple d'un dispositif de franchissement inadapté au site de Langouarde, l'un des sites d'échantillonnage (segment 2). On observe un amas de civelles escaladant les parois verticales afin d'accéder aux zones amont. Ces individus sont hors de l'eau et ne peuvent donc pas s'orienter par le sens du courant. Par ailleurs, les anguilles mises hors de l'eau ne seraient pas capables de retrouver une source d'eau (Rudsinke 1960). Photos : Sébastien Dufour & Franck Quenault (SIAEBVELG).



Pour chacun des 4 obstacles il était possible d'échantillonner des individus en train d'escalader la passe. De plus, pour les deux premiers sites, la profondeur d'eau en aval a permis un échantillonnage des individus au pied de l'obstacle. Compte tenu de contraintes liées au statut protégé de l'anguille, il n'était pas possible d'échantillonner tous les sites durant la même saison de migration. Bien que l'appellation des groupes échantillonnés puisse différer entre les articles publiés, on associera à un groupe par une lettre « C » (= Climbing) ou « R » (=Remaining, Resting) et par un chiffre correspondant au nombre d'obstacles auquel les individus ont dû faire face (0, 1, 2, 3, 4) (Figure 13).

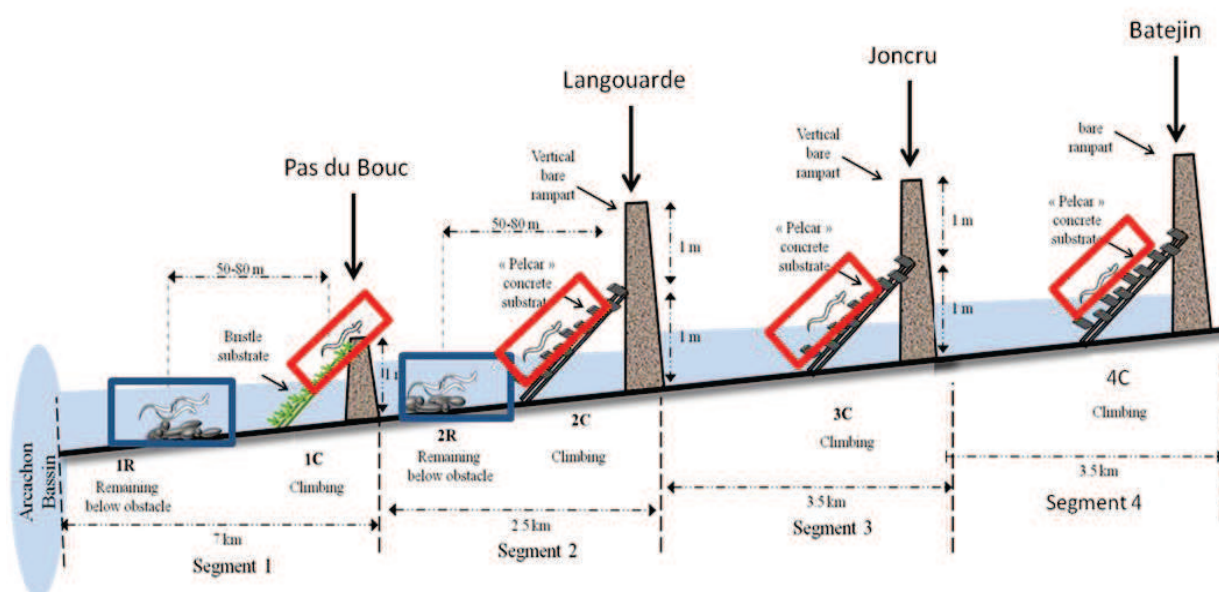


Figure 13) Schéma des sites d'échantillonnage. Les groupes d'individus échantillonnés sur la passe sont appelés « C », et ceux échantillonnés au pied de l'obstacle sont appelés « R ». Cette appellation du groupe est précédée du chiffre correspondant au numéro du segment dans l'axe aval-amont.

2. Prélèvement d'échantillons et analyse du transcriptome

Les outils de biologie moléculaire tels que la puce à ADN ou la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) permettent de mesurer le niveau de transcription des gènes rapidement et avec un coût relativement faible. Dans notre cas, la puce à ADN fut utilisée pour détecter sans *a priori* les gènes dont le niveau de transcription différait entre les différents groupes de civelles (prélevés en amont en en aval) et ce, parmi tous les gènes connus de l'espèce cible. Cette approche initiale nous a permis par la suite de sélectionner des gènes d'intérêt (i.e. uniquement ceux présentant des niveaux de transcription différents), dont le niveau de

transcription a été mesuré par la RT-qPCR sur un grand nombre d'individus, soumis à différentes conditions.

Dissection et prélèvements d'échantillons

Pour chaque étude, un échantillon de civelles/anguillettes d'environ 12 cm a été prélevé sur différents sites, les mesures de la taille et du poids des poissons ont été enregistrées. Ensuite, tous les individus ont été soit immédiatement sacrifiés, soit transportés vivants jusqu'à la Station d'Expérimentation de Saint Seurin (Irstea Bordeaux) pour les tests (common garden/ passe expérimentale). La méthode de mise à mort était le sacrifice par décapitation (coupure nette au niveau de la *medulla oblongata*). En effet, dans le cadre d'étude transcriptomique, l'euthanasie par overdose d'anesthésiant n'est pas une méthode adaptée; elle est plus lente et, comme toute molécule chimique, l'anesthésiant est susceptible d'induire des changements temporaires dans le transcriptome de l'individu (Renault et al. 2011). Les prélèvements du tissu musculaire, cervical et hépatique (étude pilote) ou du tissu cervical seul ont été réalisés et les échantillons mis dans l'azote liquide pour être ensuite conservés dans les cryotubes à -80°C, pour une analyse transcriptomique ultérieure. L'extraction des otolithes (concrétion minérale de l'oreille interne du poisson) fut également réalisée, permettant l'estimation d'âge de chaque individu.

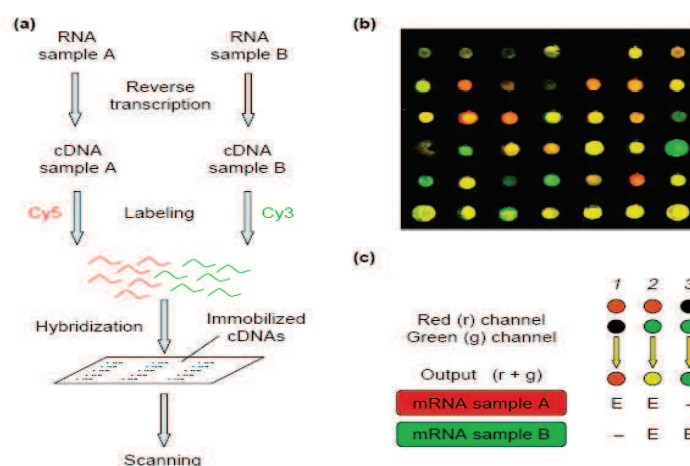
Préparation des échantillons d'ADNc

L'extraction et purification des ARNm à partir des prélèvements de terrain ou des échantillons expérimentaux ont été réalisées à la Station Marine d'Arcachon (UMR 5805 EPOC). Les échantillons ont été broyés individuellement (broyeur à billes), et les ARNm ont été extraits et purifiés à l'aide des kits commerciaux fournis par Agilent Technologies (étude préliminaire) ou Promega (études suivantes). Ensuite, les ARNm ont été retro-transcrits en ADNc (brin d'ADN complémentaire) à l'aide d'une retro-transcriptase (kits Agilent/Promega). En ce qui concerne le cerveau, la quantité de tissu disponible n'était pas suffisante pour l'analyse par puce à ADN (étude pilote). Les ARNm provenant de trois individus ont été regroupés en respectant leur site d'origine. Cette méthode, le pooling, fut également utilisée pour les autres tissus avant leur analyse par puce à ADN. Dans les cas des études réalisées au moyen de la PCR quantitative, une analyse individuelle fut réalisée.

Analyse du transcriptome par puce à ADN

Pour analyser la quantité d'ARNm et donc le niveau de transcription/activité des gènes, on procède par les étapes de préparation des échantillons (extraction, purification et rétrotranscription de l'ARNm en ADNc et labelling) et d'analyse de l'échantillon par puce à ADN (hybridation, lavages et lecture de la fluorescence), ces étapes ne seront que brièvement mentionnées, car il existe aujourd'hui une littérature approfondie sur chacun des aspects techniques de ce type d'analyse transcriptomique (Podgorniak *et al.* 2015b) (Figure 14).

Figure 14) L'analyse par puce à ADN (ici, avec deux fluorochromes) : extraction, rétro-transcription, labelling et hybridation (a), visualisation de la fluorescence (b) et interprétation des résultats (c) (Ranz & Machado 2006).



Les séquences individuelles d'ADNc sont regroupées par trois (individus provenant du même site d'échantillonnage) et marqués par un fluorochrome vert (Cyanine 3). Le site le plus en aval fut choisi comme référence. On dépose les ADNc obtenus sur la puce contenant des fragments d'ADN (sondes) qui vont s'hybrider par complémentarité avec ces derniers. La fluorescence émise par chaque spot (qui est constitué des milliers des sondes identiques et complémentaires d'un seul ARNm/gène) de la puce est analysé individuellement par un scanner à très haute résolution. La fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la quantité d'ADNc provenant de l'échantillon et donc la quantité de transcrits présents dans l'échantillon. On normalise ensuite l'intensité du signal pour chaque spot de la puce (chaque gène) en rapportant la fluorescence émise par rapport à celle mise par 10 contrôles positifs (spike, one-color microarray) et on en déduit une mesure numérique de l'expression de chaque gène proportionnelle à la quantité de l'ARNm au moment de son extraction.

Les résultats bruts de l'analyse par puce à ADN ont été normalisés et traités statistiquement à l'aide de l'Analyse de la Composante Principale (ACP) et Significance Analysis for Microarrays (SAM Pairwise ou Multiclass, avec une False Discovery Rate (erreur de type II) fixée à 5% au lieu d'une p-value des tests statistiques classiques). D'une

manière générale, deux paramètres furent pris en compte lors de la comparaison entre les sites d'échantillonnage. Il s'agissait du nombre de séquences génétiques différemment régulés (sur- ou sous-exprimés par rapport à la valeur du premier site pris pour référence) et leur facteur de multiplication (*'fold change'*), c'est à-dire la proportion d'ADN transcrit présent chez les individus issus d'un site par rapport à ceux issus du site de référence. Dans cette étude, seules les séquences génétiques dont le *fold change* était supérieur à 1,5 ont été considérées.

Chaque séquence génétique d'intérêt a été nommée grâce à la base de données EeelBase <http://compugen.bio.unipd.it/eeelbase/> (Coppe *et al.* 2010; Pujolar *et al.* 2012), la fonction de la protéine associée a été identifiée grâce aux bases de données DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) et KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Analyse de la transcription des gènes par PCR quantitative

Pour analyser le niveau de transcription des gènes d'intérêt, on a d'abord eu recours au logiciel Primer3Plus pour choisir les amorces à partir de la séquence codante du gène, en respectant leur spécificité, taille, température d'hybridation et leur non complémentarité. Ces amorces ont été ensuite utilisées lors de l'analyse par qRT-PCR temps réel (réaction en chaîne par polymérase en temps réel).

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymatique) avec pour différence une amplification mesurée tout au long des cycles d'amplification, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADNc (retro-transcrit à partir de l'ARN des échantillons) est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission pendant l'étape de polymérisation est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons (produits amplifiés formés). La fluorescence est assurée par l'ajout d'un agent intercalant (le SYBR®Green), peu fluorescent à l'état libre, mais qui augmente en fluorescence lorsqu'il est intercalé dans la double hélice d'ADN. La qRT-PCR permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc de quantifier l'ADN, la fluorescence émise étant directement proportionnelle à la quantité d'ADNc et d'ARN présent dans l'échantillon initial. Dans notre cas, nous avons eu recours à la méthode de qPCR dite relative, car nous avons rapporté la cinétique d'amplification pour un couple d'amorces spécifique à un gène d'intérêt avec celle d'un gène de référence (*housekeeping gene*, β -actine dans notre cas), c'est-à-dire un gène qui assure les fonctions

indispensables à tous types de cellules et dont le niveau de transcription est fort mais peu variable, car soumis à une sélection naturelle stricte.

3. Plasticité neuronale : recherche bibliographique et choix de gènes

Bien qu'aucune fonction spécifique n'ait été visée au départ de notre étude, les résultats de l'analyse préliminaire par puce à ADN ont montré que les différences entre les individus retrouvés en amont et en aval des obstacles concernaient uniquement le cerveau. De plus, la fonction commune des gènes détectés concernait la neurogenèse et la plasticité synaptique. Afin de consolider ces résultats préliminaires, une recherche des mécanismes et des gènes régulant les fonctions détectées a été réalisée. Elle a également permis le choix des nouveaux gènes pour les études suivantes.

3.1 Cognition, cerveau et plasticité neuronale chez les poissons

La cognition se réfère aux trois processus différents, qui permettent à l'animal de prendre des décisions : la perception, l'apprentissage et la mémorisation (Shettleworth 2010). Ces processus facilitent l'ajustement comportemental en fonction du contexte environnemental dans lequel l'animal se trouve. Par exemple, les poissons apprennent à utiliser les différents stimuli comme la position des références spatiales pour la localisation de la ressource (Warburton 2003) ou la navigation (Reese 1989), et l'intégration des informations temporelles et spatiales pour prédire des événements particuliers (Reebs 1996). En ce qui concerne la mémoire, elle sert entre autres pour la reconnaissance des conspécifiques, des endroits ou éléments vitaux pour l'individu. Peu d'études ont été faites sur les différences intraspécifiques dans la cognition chez les poissons (Brown & Braithwaite 2005; Odling-Smee *et al.* 2008), ces dernières étant liées en particulier aux facteurs écologiques, comme le taux de prédation et la complexité environnementale. En effet, le poisson n'est pas le modèle le plus prisé dans le domaine de la cognition animale.

Les poissons, à la différence des mammifères, présentent une plasticité et un développement neuronal très forts tout au long de sa vie (Zupanc & Sirbulescu 2011) et donc expriment une capacité extraordinaire de rétablissement fonctionnel du système nerveux central suite à des lésions cérébrales (Zupanc 2008). Ainsi, les études neurobiologiques, neuroanatomiques et neurophysiologiques avec un intérêt spécifique pour les poissons se basent la plupart de temps sur le phénomène de régénération suite à l'ablation des parties

spécifiques du cerveau (Zupanc & Sîrbulescu 2013). Les résultats de ce type d'études peuvent être transposables aux mammifères du fait de l'homologie fonctionnelle du cerveau entre ces deux groupes (Portavella *et al.* 2004; Salas *et al.* 2006) (Figure 15).

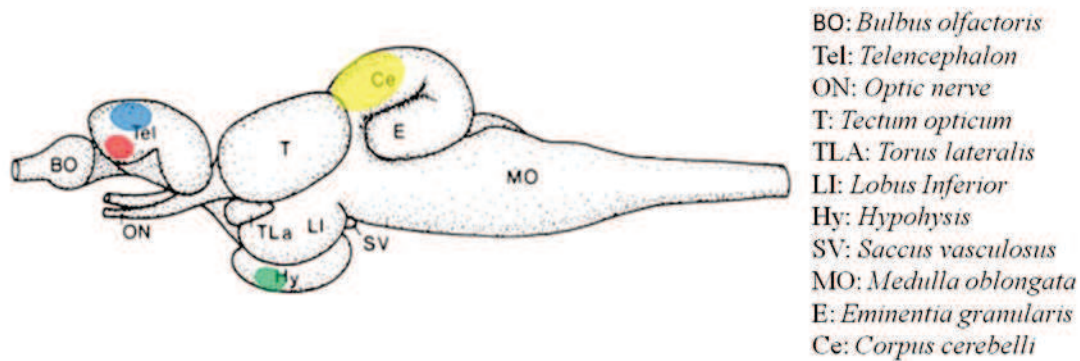


Figure 15) Schéma du cerveau de l'anguille adulte (Wullimann *et al.* 1991) et quelques fonctions associées: le cervelet (Ce, jaune) est impliqué dans l'apprentissage associatif, le pallium telencéphalique latéral (rouge), homologue de l'hippocampe chez les Mammifères, est impliqué dans l'apprentissage spatial et la mémoire, le pallium médian (bleu), homologue de l'amygdale est impliqué dans le conditionnement émotionnel, et l'hypophyse est impliquée dans le comportement social du poisson (Bshary *et al.* 2014; Hurtado-Parrado 2010; Salas *et al.* 2006).

3.2 Plasticité synaptique : mécanismes impliqués

Il existe au moins deux formes de plasticité neuronale : modification biochimique et réorganisation structurale. La première concerne la présence des neuromodulateurs (dopamine, sérotonine, noradrénaline, acétylcholine). Même si son mécanisme a été étudié en réponse à un stress chez les poissons (Summers & Winberg 2006; Winberg & Nilsson 1993), elle ne sera abordée que très brièvement ici. La deuxième concerne l'addition et la suppression des neurones ainsi que la modification de leurs connectivités. Cette connectivité se fait au niveau des branchements axonaux et dendritiques, en particulier par la modification de la densité synaptique (connexion interneuronale). On compte deux grands groupes de plasticité synaptique, plasticité à court terme (*short term depression*-STD, *short term facilitation*-STF, augmentation, potentiation post-tétanique) et à long terme (*long term potentiation* –LTP, *long term depression* – LTD). La plasticité synaptique à court terme représente une modification très brève de la synapse, de l'ordre de quelques centaines de

millisecondes à quelques minutes, qui ensuite revient immédiatement à son niveau d'activité initial. La plasticité à long terme bouleverse l'activité neuronale au-delà de la durée du stimulus, c'est-à-dire que la modification persiste même en absence de l'excitation initiale. Dans l'hippocampe, la partie du cerveau responsable, entre autres, des processus de mémorisation et d'apprentissage, les synapses excitatrices utilisent le glutamate comme neurotransmetteur, dont la libération active deux types de récepteurs à glutamate, les AMPA et NMDA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate *N*-méthyl-D-aspartate). Leurs propriétés fonctionnelles permettent le déclenchement de la potentialisation à long terme, la LTP. La LTP n'est pas le seul mécanisme de plasticité à long terme, mais il sera le seul à être décrit brièvement ici. La LTP se divise en phases précoce et tardive (E-LTP et L-LTP), cette dernière nécessitant la transcription de gènes spécifiques et la synthèse des protéines (Lynch 2004). Durant la LTP, la haute fréquence de la stimulation synaptique génère le renforcement de la connexion à long terme *via*, entre autres, la phosphorylation induite par la calmoduline kinase II (CaMK2) et le recrutement des récepteurs AMPA et NMDA (Liu & Zukin 2007; Malenka & Nicoll 1999). De manière schématique, les récepteurs AMPA sont les cibles principales de cette plasticité : leur nombre s'accroît dans la zone post-synaptique, permettant une augmentation du signal post-synaptique. Les récepteurs NMDA sont, du fait de leur forte perméabilité au calcium, essentiels à l'induction de la LTP, mais ne sont pas sujets à potentialisation. La forte entrée de calcium dans la zone post-synaptique initie les cascades de transduction du signal, tels l'activation de l'adénylate cyclase sous la dépendance de Ca^{2+} /calmoduline, l'augmentation de la synthèse de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) et l'activation de plusieurs protéine-kinases (p.ex. PKA). Ces kinases sont déplacées vers le noyau, où la phosphorylation de *cAMP response element binding protein* (CREB) a lieu. Ensuite CREB se lie au CRE (*cAMP response elements*) sur la région régulatrice de certains gènes et ainsi peut stimuler leur transcription. Parmi les protéines phares de la LTP (conversion de la E-LTP à la L-LTP) régulées par les facteurs de transcription de la famille CREB, on trouve BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*). BDNF peut se lier à des récepteurs spécifiques tels que la TrkB (*Tropomyosin receptor kinase B*), ce qui activera les tyrosines kinases. D'un autre côté, la PKA sera activée par l'augmentation locale du cAMP (par dissociation des sous-unités catalytiques des sous-unités régulatrices de cette enzyme), ce qui permettra, *via* la phosphorylation de la serine-133 du CREB, la régulation de l'expression génétique. La PKA peut aussi recruter la MAPK (*mitogen activated protein kinase*) impliquée dans la régulation de l'activité des gènes (traduction des ARN messagers, phosphorylation des facteurs de transcription). Une des étapes finales de ces cascades est l'activation des gènes

responsables de la synthèse des protéines nécessaires pour la modification des synapses déjà existantes et la formation des nouvelles. La diversité et la complexité des gènes et protéines impliquées dans tout le processus est très grande (Kelleher Iii *et al.* 2004; Sanes & Lichtman 1999; Wolf & Linden 2012) et il est difficile de représenter toutes leurs connexions sur un seul schéma. En effet, il existe au moins une dizaine de formes de LTP différentes rien que dans l'hippocampe, et le nombre des molécules impliquées dans ce phénomène peut facilement atteindre 100 (Sanes & Lichtman 1999) (Figure 16). Concernant non seulement la LTP, mais la plasticité synaptique d'une manière plus générale, la liste de gènes d'intérêt peut être différente (Figure 17). Une attention particulière a été portée aux gènes dont les séquences nucléotidiques de l'espèce concernée sont connues et pour lesquelles les liens entre les fonctions d'apprentissage, mémorisation, cognition, activité neuronale ou neurogenèse existent dans la littérature scientifique.

Glutamate receptors	Reference*				
GluR1	1	interleukin 1 β	32	Ganglioside GQ1B	62
GluR2	2	H ₂ S	33	Kinases	
mGluR1	3	β -actinin	34	inositol 1,4,5 -triphosphate-3-kinase	63
mGluR4	4	Calcium/calmodulin binding proteins		MAPK	64
mGluR5	5	calmodulin	35	src	65
mGluR7	4	RC3/neurogranin	36	fyn	66
NMDA NR1	6	calretinin	37	ERK	67
NMDA NR2A	7	GAP43/B50/neuromodulin	38	protein kinase A C β 1 subunit	68
NMDA NR2D	8	S100	39	protein kinase A RI β subunit	69
Other neurotransmitters, neuromodulators and their receptors		Ion channels		protein kinase C-gamma	70
norepinephrine and β -adrenergic receptors	9	L-type calcium channels	40	protein kinase G	71
adenosine and adenosine 2A receptors	10	olfactory cyclic nucleotide-gated channel	41	protein kinase M-zeta	72
dopamine and D1 dopamine receptors	11	Vesicle- and synapse-associated proteins		CaM kinase I	73
μ opioid receptors	12	synaptophysin	42	CaM kinase II	74
δ 1 opioid receptors	12	α -SNAP	43	CaM kinase IV	73
acetylcholine and muscarinic receptors	13	VAMP	43	ecto protein kinase	75
GABA and GABA-B receptors	14	rab3a	44	Proteases and their inhibitors	
anandamine and CB1 cannabinoid receptors	15	syntaxin 1B	45	calpain	76
orphanin NQ and nociceptin receptors	16	Synapsin I	45	calpastatin	77
serotonin and 5HT3 receptors	17	SNAP 25	46	protease nexin 1	78
sn-2 arachidonylglycerol (2-AG)	18	PSD-95	47	tissue plasminogen activator	79
endothelin-1	19	Transcription factors		plasmin	80
γ -hydroxybutyric acid (GHB) and GHB receptors	20	Retinoic acid receptor β	48	E6-AP ubiquitin ligase	81
Intercellular messengers, their synthetic enzymes and their receptors		CREB	49	Other enzymes	
CO	21	Krox 20	50	phospholipase A2	82
NO	21	Krox 24	50	phospholipase C β	83
EGF	22	Adhesion molecules		phospholipase C γ	83
basic FGF	22	ephA5	51	ADP ribosyl transferase	84
superoxide	23	ephrinA5	51	calcineurin	85
neuregulin	24	NCAM	52	protein phosphatase I	86
erbB4	24	E-cadherin	53	acetylcholinesterase	87
NGF	25	N-cadherin	53	adenylate cyclase	88
BDNF	26	thy-1	54	guanylate cyclase	71
TrkB	27	telencephalin	55	Miscellaneous	
nNOS	28	L1/NgCAM	56	Spectrin/fodrin	76
eNOS	29	HB-GAM/pleitrophin	57	GFAP	89
arachidonic acid	30	integrins	58	Stathmin RB3/XB3	90
platelet activating factor	31	integrin-associated protein	59	EBI-1 G protein-coupled receptor	91
		tenascin-C	60	Mas G-protein coupled receptor	92
		Carbohydrates		Vesl	93
		Polysialic acid	61		
		Ganglioside GM1	62		

*Because of space limitations, only a single reference is given for each molecule. In many cases, choices are arbitrary.

Figure 16) Liste (non exhaustive) des molécules impliquées dans la LTP de l'hippocampe (Sanes & Lichtman 1999). Pour certaines protéines associés ou disponibles sur cette liste, la régulation différentielle de leur niveau de transcription a déjà été détectée dans l'étude préliminaire (la famille de S100, calmoduline, thy-1) et/ou dont les niveaux de transcription ont été analysés dans les études suivantes (BDNF (*bdnf*), CaM kinase II (*camk2g*), NMDA NR1 (*grin1*), GluR3 (*gria3*), CREB (*crebp*), S100 (*s100b*)).

Immediate-Early Response Genes (IEGs): ARC, BDNF, CEBPB, CEBPD, CREB1, CREM, EGR1, EGR2, EGR3, EGR4, FOS, HOMER1, JUN, JUNB, KLF10, MMP9 (Gelatinase B), NFKB1, NFKBIB (TRIP9), NGF, NPTX2, NR4A1, NTF3, PCDH8, PIM1, PLAT (tPA), RELA, RGS2, RHEB, SRF, TNF.

Late Response Genes: INHBA, SYNPO.

Long Term Potentiation (LTP): ADCY1, ADCY8, BDNF, CAMK2A, CAMK2G, CDH2 (N-cadherin), CNR1, GABRA5, GNAI1, GRIA1, GRIA2, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2C, GRIN2D, MAPK1, MMP9 (Gelatinase B), NTF4, NTRK2, PLCG1, PPP1CA, PPP1CC, PPP3CA, PRKCA, PRKCG, RAB3A, YWHAQ (14-3-3).

Long Term Depression (LTD): GNAI1, GRIA1, GRIA2, GRIA3, GRIA4, GRIP1, GRM1, GRM2, IGF1, MAPK1, NOS1, NGFR, PICK1, PLAT (tPA), PPP1CA, PPP1CC, PPP1R14A (CPI-17), PPP2CA, PPP3CA, PRKCA, PRKG1.

Cell Adhesion: ADAM10, CDH2 (N-cadherin), GRIN2A, GRIN2B, NCAM1, PCDH8, PPP2CA, RELN, TNF.

Extracellular Matrix & Proteolytic Processing: ADAM10, MMP9 (Gelatinase B), PLAT (tPA), RELN, TIMP1.

CREB Cofactors: AKT1, CAMK2G, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2C, GRIN2D, MAPK1 (ERK2), PPP1CA, PPP1CC.

Neuronal Receptors: EPHB2, GABRA5, GRIA1, GRIA2, GRIA3, GRIA4, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2C, GRIN2D, GRM1, GRM2, GRM3, GRM4, GRM5, GRM7, GRM8, NTRK2.

Postsynaptic Density: ADAM10, ARC, DLG4 (PSD95), GRIA1, GRIA3, GRIA4, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2C, GRM1, GRM3, HOMER1, PICK1, SYNPO.

Others: KIF17, SIRT1.

Figure 17) Exemple de la liste des gènes analysés par le kit « Human Synaptic Plasticity PCR Array » disponible chez QIAGEN (SABiosciences, Cat # PAHS-126Z) (pour plus d'informations, visiter http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-126Z.html). Certains gènes de cette liste, non mentionnés par Sanes & Lichtman 1999 (Figure 16) et pour lesquels les séquences ont été décrites chez l'anguille (Coppe *et al.* 2010), ont été utilisés lors de notre étude (*jun*, *adam10*, *egr1*).

3.3 Le choix de gènes

Les gènes détectés lors de l'étude préliminaire (Chapitre 3) ont permis de d'orienter et de focaliser notre recherche vers les gènes impliqués dans plasticité neuronale du cerveau. Pour les études suivantes, le choix des gènes a porté sur la spécificité de leurs fonctions au niveau cellulaire, mais prenait aussi en compte la disponibilité des séquences et leurs liens avec les processus cognitifs suggérés dans la littérature scientifique (Salvanes *et al.* 2013; Sanes & Lichtman 1999; Wolf & Linden 2012) (Figure 18,19). Nous avons également essayé d'éviter la redondance dans les fonctions spécifiques aux mécanismes impliqués. Par exemple, même si les séquences pour les deux gènes étaient disponibles, nous avons choisi *jun* au lieu de *fos*, les deux appartenant à la famille des *Early Immediate Genes* (IEG) et étant des facteurs de transcription étroitement liés (Clayton 2000; Maruska *et al.* 2013; Tischmeyer & Grimm 1999). En effet, les analyses des niveaux de transcription des gènes réalisées à la suite de l'étude préliminaire (RT-qPCR) sont assez chronophages et ne permettent pas

d'étudier simultanément une large gamme de gènes si le nombre d'individus est important. Ainsi, l'étude portait sur un lot d'une vingtaine de gènes de fonction spécifique connue (9 gènes d'intérêt détectés par l'étude préliminaire, 11 gènes analysés à la fin du common garden, 4 gènes analysés lors de l'étude comportementale). Dans ce lot, deux gènes ont été choisis pour une fonction différente de la plasticité neurale. L'aromatase (*cyp19a1*), bien qu'impliquée dans la neurogenèse, est également responsable de la sexualisation du cerveau des poissons (Diotel *et al.* 2010; Garcia-Segura 2008). L'iodothyronine 2 deiodinase (*dio2*) est impliquée dans le métabolisme des hormones thyroïdiennes, le taux d'hormones thyroïdiennes circulant (notamment T4) étant considéré comme l'un des facteurs agissant sur le comportement de colonisation continentale des civelles (Castonguay *et al.* 1990; Edeline *et al.* 2004).

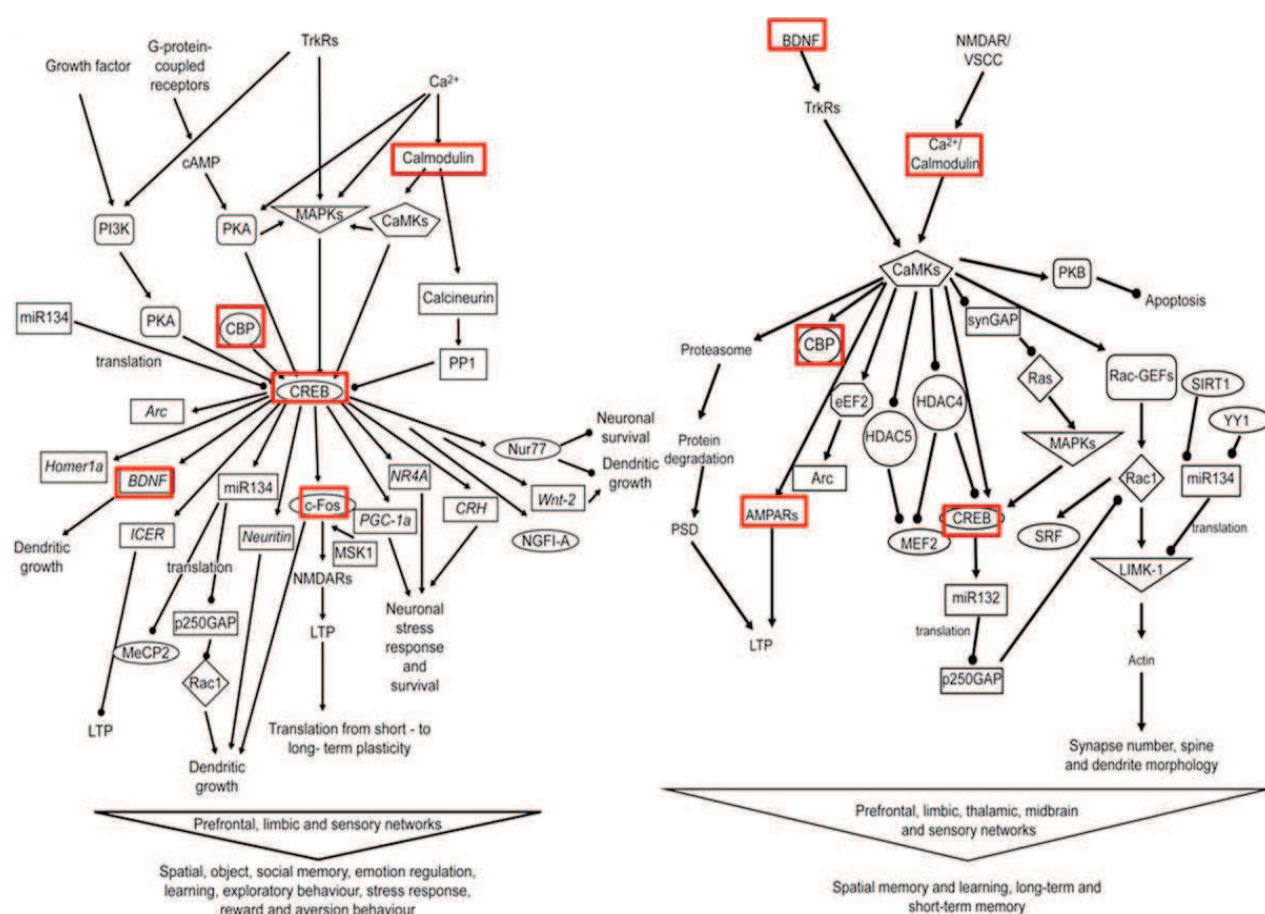


Figure 18) Exemple de cascades impliquées dans le processus cognitif. Ici, il s'agit d'une cascade couplant le Ca²⁺, la calmoduline, les facteurs de transcription IEG, les récepteurs à glutamate (AMPA), la potentialisation à long terme (LTP) de la synapse, impliquée dans l'apprentissage et la mémoire spatiale, vues sous perspectives CREB- (facteur de transcription essentiel) ou CaMK(kinases)- centrées (Wolf & Linden 2012). Les gènes utilisés dans notre étude sont entourés d'un trait rouge.

Nom du gene	Fonction	Article
family S100	calcium binding	1, 2
<i>cofilin / cfl</i>	neural growth, synapse, learning	1, 2
<i>thy1</i>	surface protein, olfaction, vision	1, 2
FABP	neural growth	1
ATPase, Ca ²⁺	Ca ²⁺ transport	1
<i>calmodulin</i>	synaptic signalling	1
<i>claudin 4</i>	tight junction	1
(cyto)keratins	cell/neuron structure	1
<i>gria3</i> / AMPA3	synaptic signalling	2
<i>grin1</i> / NMDA1	synaptic signalling	2
<i>jun</i>	synaptic signalling, learning	2, 3
<i>crebbp</i>	synaptic signalling	2
<i>adam10</i>	synaptic signalling	2
<i>s100b</i>	calcium binding	2
<i>neurod1</i>	neural growth, learning	2
<i>cyp19a1</i>	aromatase	2
<i>dio2</i>	thyroid metabolism	2
<i>camk2g</i>	memory, learning	3
<i>bdnf</i>	IEG, learning	3
<i>egr-1</i>	IEG, learning	3

Figure 19) Liste des gènes détectés et/ou sélectionnés pour notre étude. Pour une description plus détaillée et références, voir l'article correspondant.

CHAPITRE 3 :

Etude préliminaire : Puce à ADN

1. Introduction Article 1

L'objectif de cette étude pilote était de détecter les différences entre les individus rencontrés en amont et en aval des obstacles. Quels traits étudier ? Puisque les dispositifs de passage reposent tous sur la capacité de reptation des individus, l'analyse du comportement d'escalade était indiscutable. Ensuite, deux possibilités s'offraient à nous. Le choix des traits phénotypiques pouvait être basé sur les connaissances relatives aux facteurs de migration des civelles. Ainsi, les traits analysés auraient concerné la taille/pigmentation du corps, le taux d'hormones thyroïdiennes (T3, T4), les capacités de nage, le facteur de condition ou la quantité des réserves énergétiques. Alternativement, nous pouvions analyser une large gamme de traits en empruntant une démarche sans *a priori* particulier, de manière à détecter de nouveaux traits caractéristiques des groupes amont/aval. L'analyse sans *a priori* a été retenue et fut possible grâce au progrès récents dans le développement des outils de biologie moléculaire. En effet, même si le profil génétique de la population panmictique d'anguille reste relativement homogène, certains gènes peuvent avoir des profils d'activité différents. Le profil d'expression génétique, appelé aussi transcriptome ou phénotype moléculaire des individus, peut varier au niveau intra- (en fonction du stade ontogénétique ou conditions environnementale du moment par exemple) ou interindividuel (en fonction du profil génétique par exemple) et pourrait donc être soit influencé soit sélectionné par l'environnement.

Dans cette étude pilote, l'analyse du transcriptome d'environ 15000 séquences génétiques connues (Coppe *et al.* 2010; Pujolar *et al.* 2012) a été effectuée au moyen d'une puce à ADN (*microarray*). Le principe consista à comparer entre les individus amont/aval les quantités d'ARN correspondant à chacune de ces séquences génétiques connues. Les séquences comparées pour lesquelles la quantité d'ARN estimée différait significativement (avec un facteur de multiplication minimal de 1.5) ont été identifiées et labellisées comme sur- ou sous-exprimées. Une fois les gènes à régulation différentielle ciblés, il fut possible de déterminer les fonctions moléculaires associées et ainsi d'interpréter les résultats

en termes de différences fonctionnelles à l'échelle du phénotype de la cellule, de l'organe ou de l'organisme entier.

Trois sites d'échantillonnage ont été choisis sur l'axe du Canal de Porge. Une dizaine d'individus a été prélevée au pied du premier obstacle (Pas du Bouc), au pied du deuxième obstacle (Langouarde) et sur la passe du troisième obstacle (Joncru). Pour chaque groupe d'individus, une multitude de fonctions biologiques a pu être étudiée par l'analyse du transcriptome des trois tissus : le muscle, le foie et le cerveau.

2. Article 1

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Differences in brain gene transcription profiles advocate for an important role of cognitive function in upstream migration and water obstacles crossing in European eel

Tomasz Podgorniak^{1*}, Massimo Milan², Jose Marti Pujolar^{2,3}, Gregory E Maes^{4,5}, Luca Bargelloni², Eric De Oliveira⁶, Fabien Pierron^{7,8†} and Francoise Daverat^{1†}

Abstract

Background: European eel is a panmictic species, whose decline has been recorded since the last 20 years. Among human-induced environmental factors of decline, the impact of water dams during species migration is questioned. The main issue of this study was to pinpoint phenotypic traits that predisposed glass eels to successful passage by water barriers. The approach of the study was individual-centred and without any a priori hypothesis on traits involved in the putative obstacles selective pressure. We analyzed the transcription level of 14,913 genes.

Results: Transcriptome analysis of three tissues (brain, liver and muscle) from individuals sampled on three successive forebays separated by water obstacles indicated different gene transcription profiles in brain between the two upstream forebays. No differences in gene transcription levels were observed in liver and muscle samples among segments. A total of 26 genes were differentially transcribed in brain. These genes encode for, among others, keratins, cytokeratins, calcium binding proteins (S100 family), cofilin, calmodulin, claudin and thy-1 membrane glycoprotein. The functional analysis of these genes highlighted a putative role of cytoskeletal dynamics and synaptic plasticity in fish upstream migration.

Conclusion: Synaptic connections in brain are solicited while eels are climbing the obstacles with poorly designed fishways. Successful passage by such barriers can be related to spatial learning and spatial orientation abilities when fish is out of the water.

Keywords: Transcripomics, European eel, Water dams, Microarray, Synaptic plasticity, Fish brain

Background

Among anthropogenic environmental alterations, habitat loss and fragmentation are considered as a major threat to biological diversity [1] and dealing with these changes is among the greatest challenges faced by conservation biologists [2]. Habitat fragmentation of aquatic ecosystems is mainly induced by anthropogenic barriers such as dams and weirs [3]. Main effects of human-induced barriers are: (1) modification of abiotic conditions [4], (2) disruption of population and aquatic community

structure in subsequent habitats [5–7] as well as (3) disruption of gene flow [8] and (4) biodiversity loss [9].

Endemic species as well as migratory species are the most affected by water impoundment [10,11]. In the case of migratory species, habitat switch can be sometimes imperative in order to reach a particular ontogenetic stage. For diadromous species (i.e. salmonids or eels), growth and reproduction stages require different salinity environments and thus free-flowing corridors between habitats are required to fulfill their life cycle [12]. Therefore, investigating the effects of fragmentation effects on their migratory behaviour is of great importance.

European eel *Anguilla anguilla* is a facultative catadromous fish species with a particularly complex life cycle

* Correspondence: tomasz.podgorniak@irstea.fr

†Equal contributors

¹Irstea Bordeaux, UR EABX, HYNES (Irstea – EDF R&D), 50 avenue de Verdun, Cestas 33612 Cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article



that includes two trans-Atlantic migrations and two metamorphoses. European eel spawns in the remote Sargasso Sea [13]. After spawning, larvae of European eel drift back towards Europe and cross the Atlantic transported by the Gulf Stream system to the coasts of Europe and North Africa. Upon reaching the continental shelf, larvae metamorphose into glass eels and complete the migration into continental (fresh, estuarine and coastal) waters as yellow eels. After a highly variable feeding period in the continent, yellow eels metamorphose into silver eels that migrate back to the Sargasso Sea in a migration of 5,000-6,000 km. Upon reaching the Sargasso Sea, silver adults reproduce once and die. European eel is considered to be critically endangered of extinction with a 90-99% decline observed throughout the distribution range of the species in the last 30 years [14]. The drop in population numbers has affected both recruitment and pre-adult/adult stages and causes of the decline include both anthropogenic (overfishing, man-introduced parasites and diseases, pollution, habitat fragmentation) and natural factors. Among human-related barriers, construction of dams and the consecutive fragmentation of habitats is one of the possible factors contributing to this sharp decline, mainly because water impoundment preclude (1) the upstream migration of glass eels to feeding grounds and (2) the spawning migration of adults from the feeding to the spawning grounds in the Sargasso Sea.

Studies addressing the impact of migration barriers on eel upstream migration have mainly focused on quantitative aspects such as mortality of glass eels/elvers downstream of dams due to predation, diseases or intra-specific competition [15]. Such studies also quantified barrier permeability by estimating the abundance of eels on either site thereof. Indeed, many evaluations of single-species specific fishways accounted for passage and attraction efficiency and were only based on the proportion of individuals approaching, engaging and succeeding to pass designed apparatus [16,17]. Although several phenotypic traits are expected to be associated with glass eel upstream migration [18,19], none of them has been studied in the context of passage by water obstacle. In this sense, large individual size [20], swimming speed and high energy reserves could facilitate the success of passage, whereas activity, exploratory behaviour and sensibility to environmental cues [21] could increase the probability to find the fishway entrance.

Several authors have proposed a hypothesis of energy- or thyroid- dependent propensity to migrate in glass eels [18,22,23]. According to this hypothesis, the thyroid hormone metabolism is involved in the upstream migration of glass eels. This is in agreement with previous experimental studies that showed that thyroxin (T4) is involved in the migratory behaviour of fish [24,25]. A role

of the thyroid hormone metabolism in climbing waterfalls has also been suggested in juvenile American eels [26]. Thus, the interindividual variations in thyroid hormone metabolism could be responsible for interindividual variations in "motivation" of juvenile eels to swim against the current and to climb water obstacles.

The aim of the present study was to investigate the interindividual variation of phenotypic traits involved in the passage of water barriers. The chosen approach re-lied on the comparison of gene transcription (mRNA) patterns among wild glass eels collected below and above successive obstacles dispersed along the same river course.

A non a priori approach was chosen to identify individual traits that could differ between downstream and upstream fish. Microarray analysis was used to detect interindividual patterns of gene transcription from a large and functionally diverse set of genes (14,913 annotated contigs [27]) from fish sampled above and directly below the barriers in a river carefully selected for its homogenous conditions.

Three different tissues were sampled: (1) muscle to provide information on fish swimming capacities [28], (2) liver as a proxy for the physiological state of organism [29], and (3) brain, to provide information on perception of environmental cues, arousal, motivation, learning and many other functions involved in behavioural patterns such as those linked to hormone metabolism [22,23].

Methods

All procedures used in this study were approved by the Aquitaine fish-birds ethic committee (a committee approved and registered by the French Ministry of Higher Education and Research under number 73).

Sampling site

Canal des Etangs, a freshwater corridor in South-Western France (44.75-44.95 N, 1.1-1.2 W) is a former artificial canal, built in 1850, linking Arcachon Basin to Lacanau Lake. The river line is linear, whereas the water flow remains homogenous and controlled by several weirs. Three successive low-distanced obstacles were built along the river length. The first weir (1,5 m height) is located at 4 km from the tidal limit and equipped with a fish ladder (6 m length, 45° slope) specifically designed for glass eels. It determines the upper limit of the most downstream 4 km section of the canal called segment 1 (Pas du Bouc; +44° 50' 27.95", -1° 9' 8.09"). The second (Langouarde, +44° 51' 32.92", -1° 9' 5.03") and the third (Joncru; +44° 52' 57.13", -1° 8' 11.70") weirs are different from the first one, but similar between them; they are larger (2,5 m height) and equipped with identical fishways (rock ramp). The distances from the first weir to the 2nd and 3rd one are respectively 2.3 and 5.3 km (Table 1).

Table 1 Number of pools of tissue samples from each segment used for microarray analyses

Sampling site	Tissue (number of pools analyzed by DNA microarray analyses)			Distance from the 1st segment (km)
	Brain	Muscle	Liver	
Pas du Bouc (segment 1)	3	3	3	0
Langouarde (segment 2)	3	3	3	2.3
Joncru (segment 3)	3	0	3	5.3

Each pool corresponds to 3 individuals from the same segment. Additionally, the distance from the sampling site to the first segment is shown.

Sampling

Eels were collected using electrofishing during three consecutive days 6–8th of June 2012 under similar climatic and hydrological conditions. Individuals were sampled below the obstacle, close to the fishway entry in segment 1 and 2. Fish from the segment 3 were sampled on the fishway, as water depth before the obstacle, approximately 2 meters, precluded the use of electrofishing. Ten individuals were selected from each site according to their body size (between 83 and 155 mm) and health status (no externally visible pathogens) to minimize the potential bias. Sampled and selected fish were immediately sacrificed by decapitation and the whole brain (ca. 3.5 mg), liver (ca. 30 mg) and muscle tissues (ca. 40 mg, posterior bottom body part, skin removed) were dissected and stored in separate tubes with RNeasy lysis buffer (1 mL, Qiagen) for gene transcription analysis. Additionally, individual weight was measured for relative condition factor (K_n) calculation [30] and otoliths were extracted for further age analysis.

Otolith analyses

Sagittal otoliths were embedded in glass slides and submerged by a drop of glue. The otolith was then polished until the core was reached, etched with 10% EDTA, stained with 5% toluidine blue to enhance the annuli and observed with optical microscope (Nikon Eclipse 90i, Japan). For each otolith, age estimation by counting the annuli around the primordium was performed by two independent readers.

Microarray analyses

Samples of brain, muscle and liver were homogenized by means of a bead mill homogenizer (45 sec at 3000 oscillations per sec, Mixer Mill MM 200, Retsch). Total RNAs were extracted using the Absolutely RNA RT-PCR Miniprep kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. A total of 9 fish were used for each sampling site, i.e. 3 pools of 3 individuals by site. RNA quality was evaluated by electrophoresis on a 1% agarose gel. RNA purity and concentration was determined using a NanoDrop spectrophotometry and Agilent 2100

Bioanalyzer. Samples were considered as of good quality RNA when showing A260/280 and A260/230 ratios close to 2 and a minimum RIN (RNA Integrity Number) of 8.

Microarray analysis was conducted using an European eel-specific array consisting of a total of 14,913 probes based on a large collection of high-throughput transcriptomic sequences [27]. Probe sequences and further details on the microarray platform can be found on the GEO database under accession number GPL15124. Sample labelling and hybridization were carried out following the Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol (Low Input Quick Amp Labelling) [31]. For each individual, 100 ng total RNA were linearly amplified and labelled with the fluorescent dye Cy3-dCTP. In order to monitor microarray analysis work-flow, Agilent Spike-in Mix (a mixture of 10 different viral poly-adenylated RNAs) was added to each RNA sample before amplification and labelling. Labelled cRNA was purified with Qiagen RNeasy Mini Kit and sample concentration and Cy3 specific activity were measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer.

A Cy3 specific activity between 8 and 17 pmol Cy3 per μ g cRNA was considered adequate for hybridization. Prior to hybridization, a total of 600 ng of labelled cRNA was fragmented for 30 min at 60°C by adding 5 μ l 10X Blocking Agent and 1 μ l Fragmentation buffer, and finally diluted with 25 μ l 2X GE Hybridization buffer. A volume of 40 μ l was dispensed into the backing slide, assembled to the microarray slide (each slide containing eight arrays) and placed in the hybridization chamber. Slides were incubated for 17 h at 65°C in an Agilent Hybridization Oven. Afterwards, slides were removed from the hybridization chamber, disassembled in GE Wash Buffer 1, and washed for 1 min in GE Wash Buffer 1 followed by one additional wash for 1 min in GE Wash Buffer 2. Hybridized slides were scanned at 5 μ m resolution using an Agilent DNA microarray scanner. Slides were scanned at two different sensitivity levels (XDR Hi 100% and XDR Lo 10%) to increase the power to detect both lowly and highly expressed genes. The two linked images generated were analyzed together. Data were extracted and background subtracted using the standard procedure in Agilent Feature Extraction (FE) software v. 9.5.1. Data was normalized using a quantile normalization procedure using R (<http://www.rproject.org/>). Normalized fluorescence data from the arrays have been deposited in the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE56040. Differentially transcribed genes across samples were identified using the program SAM (Significance Analysis of Microarrays) version 4.0 [32], with the FDR cutoff of 5%. Groups (pools of individuals from each of three segments) were compared using the two-class unpaired test and up-and-down regulated

genes were identified. A minimum fold change of 1.5 between groups was considered.

In total, 14,913 genetic sequences were analyzed from brain and liver of 27 individuals (9 pools of three individuals) and from muscle of 18 individuals (no samples from the third segment) (Table 1).

Quantitative RT-PCR validation of microarray results

A total of 6 genes showing different transcription levels among segments (claud4, cfl1, s100a1, s100a6, s100a11, thyl) were chosen to validate the microarray results by means of quantitative real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). For each gene, specific primer pairs were determined using the Primer3-Plus software [33] (see Additional file 1: Table S1). Gene transcription level was measured by quantitative real-time Reverse transcribed-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), using the β -actin gene as reference. Amplification of cDNA was monitored using the DNA intercalating dye SyberGreen. Real-time PCR reactions were performed in a MX3000P (Stratagene) following the manufacturer's instructions (one cycle at 95°C for 10 min, and 40 amplification cycles at 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s). Each 25 μ L reaction contained 1 μ L of reverse transcribed product template, 12.5 μ L of mix including the SyberGreen fluorescent dye and the enzyme (GoTaq Probe qPCR Master Mix, Promega), 9.5 μ L of sterilized pure-water and 2 μ L of the gene-specific primer pair at a final concentration of 200 nM for each primer. Reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product and by electrophoresis. The dissociation curve was obtained by following the SyberGreen fluorescence level during gradual heating of the PCR products from 60 to 95°C. Relative quantification of each gene transcription level was normalized according to the β -actin gene transcription. Hence, during our experiment, total RNAs were quantified and a same quantity was used for reverse-transcription. During the subsequent qPCR amplifications, the output cycle corresponding to β -actin was examined. This output was always obtained around the same output cycle and no significant variations were observed among conditions, demonstrating the relevance of the β -actin as reference gene in our conditions.

Statistical analyses

Comparisons among fish groups were performed by analysis of variance (ANOVA), after testing the assumptions of normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedascity (Bartlett test) of the error terms. When assumptions were not met, the non-parametric Kruskal Wallis test was used. If significant effects were detected, a Tukey HSD test was used to determine whether means between pairs of samples were significantly different from each other. Computations were performed using R (<http://www.r-project.org/>).

Results

Morphometric data

First, no difference in length or weight were observed among segments ($p = 0.548$). In addition, no age difference was observed among segments ($p = 0.497$). At the opposite, the relative body condition was significantly influenced by sampling site (Table 2) and post-hoc analysis indicated significantly lower Kn values in fish sampled in the 3rd segment (Joncru) in comparison with those sampled from the 1st and the 2nd segments ($p < 0.001$ and $p = 0.012$ respectively). No difference was observed between the 1st and the 2nd segment ($p = 0.12$) (Table 2).

Microarray results

No differences in gene transcription levels were observed in liver and muscle samples among segments. The only differences were observed in the brain tissue (Table 3). Only few differences ($n = 5$ genes, FDR cut-off = 5%) were observed between segments 1 and 2 (Table 3). A larger number of genes was differentially transcribed when comparing segment 3 with the other two segments: 50 genes between segments 1-3 and 74 genes between segments 2-3 (FDR cutoff = 5%).

A total of 40 genes were common to the comparisons between segments 1-3 and segments 2-3. Moreover, all these genes were up-regulated in the most upstream segment. Indeed, these common genes showed a progressive pattern of expression, i.e. the more upstream the segment (or distanced), the more the genes were over-expressed. Differences in regulation of gene expression between the most distanced segments were up to two times higher (shown in bold, Table 4) than those determined between close-distanced segments.

qPCR validation of microarray results

To validate microarray data, the transcriptional level of 6 genes that showed strong variations in their transcription levels among sampling sites was measured by qRT-PCR method. These two independent measures, by microarray and qRT-PCR, of transcript abundance gave consistent results, i.e. similar fold changes were observed (see Additional file 1: Figure S1).

Table 2 Size, weight, age and relative condition factor (Kn) of glass eels sampled along the three segments (mean \pm SE, $n = 9$ per site)

Origin	Length (mm)	Weight (g)	Age (y)	Kn
Segment 1	125.22 \pm 21.59	3.39 \pm 1.70	1.33 \pm 1.18	1.20 \pm 0.13 ^a
Segment 2	116.44 \pm 19.13	2.32 \pm 1.18	0.83 \pm 0.72	1.06 \pm 0.18 ^a
Segment 3	117 \pm 14.98	1.81 \pm 0.75	1.50 \pm 1.05	0.82 \pm 0.16 ^b

Means designated with different letters (a,b) are significantly different (Tukey's HSD test, $P < 0.05$).

Table 3 Number of genes with significant transcription level differences in fish brain sampled along three river segments separated by water obstacles (SAM Pairwise comparison; FC > 1.5; FDR cutoff = 5%)

COMPARISON	UP-REGULATED	DOWN-REGULATED
Segment 2 vs 1	0	5
Segment 3 vs 1	49	1
Segment 3 vs 2	54	20

For each comparison, the most downstream segment concerned was used as reference.

Discussion

Energetic costs of obstacle passage

Eels sampled in the upstream and downstream segments of an impounded watercourse did not show any difference in terms of age, weight or length, suggesting that the ontogenetic stage of fish was homogenous along the river. Indeed, size was previously found to be the best proxy to assess the ontogenetic stage of glass eels and its related locomotory behaviour [34]. Thus, in the present study, even if an effect of ontogenetic stage cannot be completely excluded, it appears unlikely that differences observed in fish brain could be explained by the life stage of fish.

In contrast, the fact that relative body condition (Kn) was lower in eels from the most upstream group in comparison to those sampled downstream could imply that passage of water barriers is an energetically and meta-bolically requiring event [35]. An alternative hypothesis could be that since glass eels do not feed during their up-stream migration [15], the distance covered to reach up-stream segments might have reduced their energy reserves [36]. Our results are contradictory to a previous study [37], where tendency to migrate was associated with higher energy reserves. In the present study, no differences in muscle and liver gene transcription among fish groups were found, which suggests that energy was not the main cue explaining the difference in passage behavior. However, it is important to notice that muscle samples from the third segment were missing (Table 3), thus precluding a full inter-segment comparison for this tissue.

Differences in brain transcriptome profiles associated with upstream migration

Microarray analysis of brain tissue revealed that some genes were overexpressed in fish from the most up-stream segment of the river compared to the two down-stream sections.

Interestingly, most of these overexpressed genes were common to the comparisons between segments 1-3 and segments 2-3. In addition, the fold changes for most of the genes were found to increase with the number of obstacles crossed by glass eels. The analysis of the biological function of these common genes can provide

new insights into the phenotypic traits that are stimulated and/or selected after obstacle passage (Figure 1). Among the 40 common overexpressed genes, 4 genes encoding for proteins belonging to the S-100 family proteins were identified.

The S-100 proteins [38,39] are known to control the intracellular homeostasis of calcium, which is one of messengers mediating the effects of neurotransmitters [40]. Moreover, S-100 proteins are also involved in microtubules and microfilaments synthesis [41,42]. They contribute to a broad spectrum of biological processes in the brain including cell migration, gene expression and neural signaling and activity [43] and even learning and memory at a higher biological level [44]. Calcium signaling is indeed an important pathway controlling neuronal activity, fast axonal flow and memory [45,46]. One of the S-100 members, S100A6 (Calcyclin), was shown to be highly expressed in rat brain neurons [47], and its suggested functions include cell proliferation, differentiation [48] as well as cytoskeletal rearrangements [49,50] and cellular signal transduction [51]. At a higher biological level, S100A6 was shown to be associated with memory formation in rats [52]. Another S-100 member is S100A11 (Calgizzarin), involved in regulating growth of cells [53] such as keratinocytes [54]. Interestingly, both S100A11 and S100A6 are specific targets of S100B [55], which is involved in neural plasticity [56]. S100A1 protein could be associated with synapsin and is involved in calcium dependent synaptic vesicle trafficking [57]. Moreover, an association between exploratory behaviour and S100A1 has been suggested in mice [58]. Finally, S100P protein is involved in cytoskeletal dynamics [59] and cell proliferation [60].

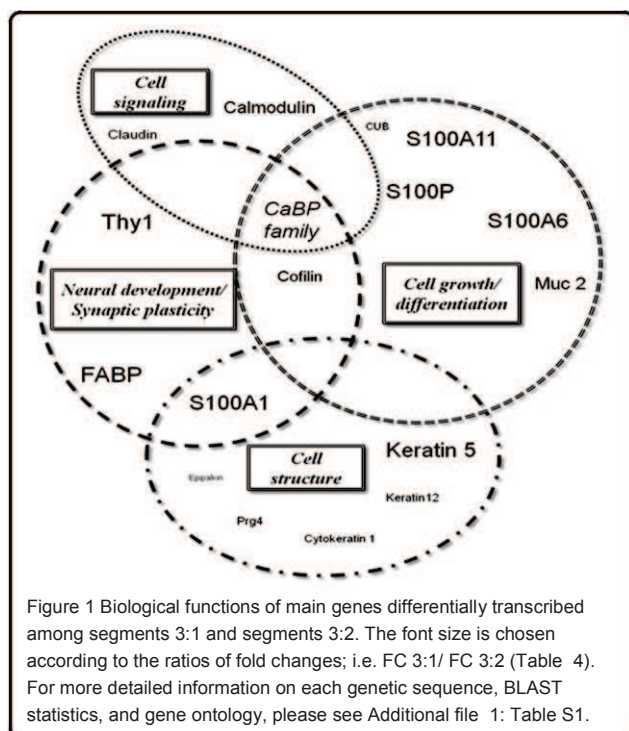
Another overexpressed gene was the cytoskeletal Cofilin (or ADF). This gene encodes for a protein that is involved in actin filament destabilization [61], which in turn allows dendritic development and differentiation, as well as neural polarization in mammalian brain [62] and axonal specialization [63]. Cofilin is also involved in other similar functions, such as axogenesis, growth cone guidance and dendritic spine formation [64]. A role in synaptic plasticity in rats [65] and associative learning has been proposed in both rats and mice [66-68].

Another up-regulated gene was claudin 4, which is involved in epithelial tight junction [69] which in turn allows intercellular communication. Moreover, epithelial tissue is rich in intermediate filaments and cytokeratins, which could be linked with other genes overexpressed in glass eels found upstream. Thus, the genes encoding for the cytokeratin 1 and keratin 12 were found to be overexpressed in migratory eels. Keratins are structural proteins found in neurons and glial cells [70]. Keratins are also known for their transient overexpression during

Table 4 Significant fold changes (FC) in gene transcription levels in eels from segment 3 as compared to individuals from segment 2 (FC 3:2) or from segment 1 (FC 3:1) (SAM analysis, FDR cutoff = 5%)

NAME	FUNCTION	EelBase number	FC 3:1	FC 3:2	FC 3:1/FC3:2
S100P	calcium binding	eeel2_rep_c5535	12.7	6.1	2.1
S100P	calcium binding	eeel2_s9035	12.4	6.0	2.1
S100P	calcium binding	eeel2_s8956	11.8	6.7	1.8
S100P	calcium binding	eeel2_s8475	9.8	6.1	1.6
S100A11	calcium binding	eeel_rep_c16089	16.1	7.4	2.2
S100A11	calcium binding	eeel_rep_c58988	15.1	7.4	2.0
S100A11	calcium binding	eeel2_rep_c5969	14.0	7.3	1.9
S100A6	calcium binding	eeel2_s6035	14.3	6.5	2.2
S100A1	calcium binding	eeel2_rep_c8719	14.2	7.1	2.0
S100A1	calcium binding	eeel_s9222	12.0	9.1	1.3
Keratin 5	cell structure	eeel_rep_c59287	29.2	14.5	2.0
Keratin 12	cell structure	eeel2_rep_c5249	5.2	4.4	1.2
Keratin 12	cell structure	eeel_s8804	7.8	8.3	0.9
Keratin 12	cell structure	eeel_c8960	8.0	8.5	0.9
Cytokeratin 1	cell structure	eeel_rep_c58375	6.9	7.2	1.0
Cytokeratin 1	cell structure	eeel_c10204	7.3	7.7	0.9
Keratin	cell structure	eeel_c5504	7.7	8.7	0.9
Keratin	cell structure	eeel_c13622	8.3	9.0	0.9
Non muscle cofilin 1	neuralgrowth	eeel2_s5802	4.8	3.3	1.4
Non muscle cofilin 1	neuralgrowth	eeel2_s5819	4.0	3.0	1.3
Non muscle cofilin 1	neuralgrowth	eeel2_s5889	3.6	3.0	1.2
C59 protein	bacterial infection	eeel_c3624	9.2	3.0	3.1
Thy1 protein	surface glycoprotein	eeel_c9925	9.4	3.9	2.4
SH3 protein	unknown in brain	eeel2_rep_c5904	10.9	5.0	2.2
FABP protein	neural growth	eeel2_s8168	10.3	5.0	2.1
Mucin 2	unknown in brain	defence system	13.5	8.4	1.6
Intelectin 1	defence system	eeel2_c833	6.9	4.4	1.6
ATPase, Ca++ transporting	unknown in brain	eeel_2_rep_c8320	12.3	7.8	1.6
Calmodulin	synaptic signaling	eeel_c13874	11.5	7.4	1.6
Claudin 4	tight junction	eeel2_c529	6.1	4.6	1.3
Unnamed	unknown in brain	eeel2_c497	4.6	3.7	1.2
L0C100135339	unknown in brain	eeel2__rep_c4986	12.6	10.3	1.2
C2A protein	unknown in brain	eeel_rep_c35338	2.3	2.0	1.2
Zona pellucida-like protein	unknown in brain	eeel2_s8124	4.6	4.0	1.2
C13antigen	unknown in brain	eeel_c14624	10.2	8.9	1.2
Proteoglycan 4	unknown in brain	eeel2_c3589	2.5	2.3	1.1
Serotriflin	unknown in brain	eeel2_rep_c5326	3.3	3.2	1.1
BRAFLDRAFT_63199	unknown in brain	eeel2_s7960	2.4	2.5	1.0
Epiplakin	unknown in brain	eeel_rep_c28794	4.1	5.9	0.7
Mucin5	unknown in brain	eeel2_c2120	5.3	9.3	0.6

The ratios of fold changes; i.e. FC 3:1/ FC 3:2 equal or superior to 2 are shown in bold. Only sequences with FC ≥ 2 are shown.



neural differentiation from polymorphic cells in rabbits [71]. Calmodulin is a well-studied protein involved in calcium-related [72] synaptic neurotransmission [73] and calcium-dependent gene expression [74]. Together with several transcription factors from the IEG (Immediate Early Genes) family under its regulation, calmodulin is strongly linked to learning and memory [75–78], as found in rats. Indeed, genes belonging to the IEG group are among the first genes regulated in response to environmental stimuli [79]. They are involved in long term potentiating (LTP) and in the establishment of long term memory that requires rapid de novo synthesis of proteins [80]. Among the other overexpressed genes, Thy1 encodes a neural surface glycoprotein that was shown to play a role in axonogenesis in rats [81] and in olfactory system development in mice [82]. Fatty acid binding protein (FABP) are involved in several functions in brain, among which neural development and cognitive processes appear to be common to the functions of other overexpressed genes in this study [83].

None of the overexpressed genes were related to thyroid activity, such as iodothyronine deiodinase type I and III. Thus, the hypothesis of thyroid dependent propensity to migrate [84] or climb obstacles [26] was not supported by our results. In contrast, overexpressed genes in upstream eels were mainly involved in cellular signaling, neural development and differentiation, as well as synaptic plasticity.

Water obstacle effects on gene expression

The difference in gene transcription in fish brain between the most upstream group and the two others could

be interpreted either as a difference in brain development [85] or as a difference in cognitive, learning and memory abilities between groups. Fish brain growth is allometric and development of its various parts is linked to environmental conditions [86–89]. Previous experimental investigations pointed out the association between behavioural flexibility and cognitive abilities [90]. Indeed, personality and coping style concepts were both related to individual capacities in spatial memory and learning abilities, where differential regulation of genes involved in neurogenesis was emphasized [91].

Phenotypic traits highlighted in our study seemed to be related to cognition. In our case study, passage through river impoundments would stand for a hard cognitive task as it involves spatial recognition while climbing the walls and route choice based on perception of visual cues, which is rather unusual for juvenile eels [85]. Indeed, water obstacle passage often requires to climb and to get out of the water, where the extremely developed olfactory system of eel could be less useful than in the aquatic environment, making any behavioural decision demanding higher cognitive appraisal than relying on environmental cues. Passing non-natural obstacles such as water dams could represent a real conundrum for eels and could impede the upstream migration for those with undeveloped or with no ability to develop cognitive functions.

Gene induction by obstacle crossing?

The overall results suggested a difference in brain functioning between individuals successfully crossing the water obstacles and those situated on the downstream part of water impoundment. Whether gene transcription was temporarily induced by the passage event or whether these differences pre-existed in glass eels before they met the obstacle is difficult to decipher. Indeed, transcriptomic analysis provided phenotypic data, but also represented an intermediary step from genotype towards functional phenotype [92]. Gene expression could be therefore interpreted as a physiological acclimation or phenotypic plasticity [93,94]. Other studies used gene transcription patterns as indicators of adaptive divergence [95,96].

Several studies on European eel considered transgenerational local adaptation hypothesis as less likely, all the more so because of random mating and absence of habitat choice at least during larval dispersal [97]. Previous studies failed to reveal a clear inter-location genetic heterogeneity of eels across Europe [98], and selection on locally adaptive traits may be too costly for eel [99]. Instead, phenotypic plasticity was hypothesized as the best strategy to deal with habitat heterogeneity in such cases [100,101]. A recent experimental study on American eel has proposed an effect of both origin and environment (salinity), as well as its interaction on gene expression [102]. However, differences in plastic responses were higher between

environments within origin than gene expression variation between origins for both rearing environments, suggesting that phenotypic plasticity is not the only cause of phenotypic variation in eel, yet its contribution to the process re-mains overwhelming in front of (epi) genetic differences related to sampling location.

In our case study, changes in gene transcription profiles could be temporarily induced when eels cross the obstacle. The highest differences in gene transcription in brain were found for fish sampled at the third most upstream group while fish were passing the fishway. The hypothesis of temporary induction of gene transcription while crossing the obstacle could be strengthened, not only by the phenotypic plasticity of eel per se, but also by the acknowledged and functionally pertaining high plasticity of the brain [91,103,104].

Conclusion

Our results showed significant differences in gene transcription in the brain of glass eels sampled above and below the water obstacles. Although the influence of swimming distance on molecular phenotypes has to be taken into account by further analyses of non-impounded watercourse, brain plasticity and cognitive function seem to play an important role in the capacity of glass eels to cross aquatic obstacles. Two main directions for the further studies could be proposed. First, a comparison between climbing and remaining eels within the same location would allow focusing on the climbing event only. Next, the persistence of gene expression patterns could be tested by a long-term common garden experiment, thus explaining its proximate cause by separating the phenotypic plasticity and genetic components.

Availability of supporting data

Probe sequences and further details on the microarray platform can be found on the GEO database under accession number GPL15124. Normalized fluorescence data have been deposited in the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE56040.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Comparison of fold changes (FC) between the transcription levels of brain genes encoding for Claudin 4, Cofilin 1, S100A1, S100A11 and S100A6 proteins and Thy-1, obtained by microarray (white bars) and RT-qPCR analysis (black bars). Two fold changes are compared: A) between the segments 3:1 and B) between the segments 3:2. Table S1. Sequences of specific primers pairs used in quantitative RT-PCR analyses. Table S2. Details about the genes that were differentially transcribed in eels from segment 3 as compared to individuals from segment 2 (FC 3:2) or from segment 1 (FC 3:1).

Competing interests

The data of this paper are original and no part of this manuscript has been published or submitted for publication elsewhere. The authors have no competing interests in this study.

Authors' contributions

TP, FD and FP have performed sampling, otolith and tissues extraction, RNA extraction and retrotranscription to cDNA. MM and MP have performed all the steps of microarray analysis. GM and EO participated in study design and interpretation of results. LB provided the access to ca. 15000 contigs microarray of European eel. All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Lorenzo Zane, Stefania Bortoluzzi, Alessandro Coppe and all members of AGC (Anguilla Genomics Consortium) for their contribution to the ca. 15.000 contigs microarray of European eel and their permission to use the EELBASE 2.0 (The European eel transcriptome database version 2, <http://compgen.bio.unipd.it/eeelbase/>). We are very grateful to Alice Laharanne and other members of Fédération de Pêche de Gironde, Nicolas Deligne, Romaric le Barh (Irstea Bordeaux) and Sebastien Dufour (Syndicat Intercommunal d'Aménagement des Eaux du Bassin Versant des Etangs du Littoral Girondin) for their help in sampling, and we truly acknowledge Christian Rigaud (Irstea Bordeaux) for his field work help and many valuable remarks throughout this study. This work has been supported through the "HYNES" collaborative project between Irstea and the French Electric Company (EDF).

Author details

¹Irstea Bordeaux, UR EABX, HYNES (Irstea – EDF R&D), 50 avenue de Verdun, Cestas 33612 Cedex, France. ²University of Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro 35020 PD, Italy. ³Department of Bioscience, Aarhus University, Ny Munkegade 114, Aarhus C DK-8000, Denmark. ⁴Centre for Sustainable Tropical Fisheries and Aquaculture, Comparative Genomics Centre, College of Marine and Environmental Sciences, James Cook University, Townsville Qld 4811, Australia. ⁵Laboratory of Biodiversity and Evolutionary Genomics, University of Leuven (KU Leuven), Leuven B-3000, Belgium. ⁶EDF R&D LNHE, HYNES (Irstea-EDF R&D), 6, quai Watier, Bat Q, Chatou 78400, France. ⁷Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, Talence F-33400, France. ⁸CNRS, EPOC, UMR 5805, Talence F-33400, France.

Received: 5 December 2014 Accepted: 27 April 2015

Published online: 12 May 2015

References

- Fischer J, Lindenmayer DB. Landscape modification and habitat fragmentation: A synthesis. *Glob Ecol Biogeogr*. 2007;16:265–80.
- Soule ME. Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 1986.
- Benetateau CL, Mandrak NE, Heath DD. The effects of river barriers and range expansion of the population genetic structure and stability in Greenside Darter (*Etheostoma blennioides*) populations. *Conserv Genet*. 2009;10:477–87.
- Bunn SE, Arthington AH. Basic principles and ecological consequences of altered flow regimes for aquatic biodiversity. *Environ Manage*. 2002;30:492–507.
- Hauer FR, Stanford JA, Ward JV. Serial discontinuities in a Rocky Mountain river. II distribution and abundance of trichoptera. *Regul Rivers: Res Manag*. 1989;3:177–82.
- Araújo FG, Pinto BCT, Teixeira TP. Longitudinal patterns of fish assemblages in a large tropical river in southeastern Brazil: Evaluating environmental influences and some concepts in river ecology. *Hydrobiologia*. 2009;618:89–107.
- Mueller M, Pander J, Geist J. The effects of weirs on structural stream habitat and biological communities. *J Appl Ecol*. 2011;48:1450–61.
- Wofford JEB, Gresswell RE, Banks MA. Influence of barriers to movement on within-watershed genetic variation of coastal cutthroat trout. *Ecol Appl*. 2005;15:628–37.
- Freeman MC, Pringle CM, Jackson CR. Hydrologic connectivity and the contribution of stream headwaters to ecological integrity at regional scales. *J Am Water Resour Assoc*. 2007;43:5–14.
- Liermann CR, Nilsson C, Robertson J, Ng RY. Implications of dam obstruction for global freshwater fish diversity. *BioScience*. 2012;62:539–48.
- Funk WC, Greene AE, Corn PS, Allendorf FW. High dispersal in a frog species suggests that it is vulnerable to habitat fragmentation. *Biol Lett*. 2005;1:13–6.
- Postel S. Rivers for life : managing water for people and nature/Sandra Postel and Brian Richter. Washington: Island Press; 2003.

13. Kleckner RC, McCleave JD. The northern limit of spawning by Atlantic eels (*Anguilla* spp.) in the Sargasso Sea in relation to thermal fronts and surface water masses. *J Mar Res.* 1988;46:647–67.
14. Kettle AJ, Asbjørn Vøllestad L, Wibig J. Where once the eel and the elephant were together: Decline of the European eel because of changing hydrology in southwest Europe and northwest Africa? *Fish Fish.* 2011;12:380–411.
15. Tesch F-W, Thorpe JE. The eel. Oxford: UK: Blackwell Science: The Fisheries society of the British isles; 2003.
16. Cooke SJ, Hinch SG. Improving the reliability of fishway attraction and passage efficiency estimates to inform fishway engineering, science, and practice. *Ecol Eng.* 2013;58:123–32.
17. Kemp PS, O'Hanley JR. Procedures for evaluating and prioritising the removal of fish passage barriers: A synthesis. *Fish Manag Ecol.* 2010;17:297–322.
18. Edeline E, Dufour S, Elie P. Proximate and Ultimate Control of Eel Continental Dispersal. In: Thillart G, Dufour S, Rankin JC, editors. *Spawning Migration of the European Eel.* Volume 30. Netherlands: Springer; 2009. p. 433–61. *Fish & Fisheries Series.*
19. Fontaine M, Callamand O. Sur certains facteurs des migrations de l'anguille. *Bulletin de la Société Zoologique de France.* 1941;66:68–76.
20. Piper AT, Wright RM, Kemp PS. The influence of attraction flow on upstream passage of European eel (*Anguilla anguilla*) at intertidal barriers. *Ecol Eng.* 2012;44:329–36.
21. Kemp PS, Anderson JJ, Vowles AS. Quantifying behaviour of migratory fish: Application of signal detection theory to fisheries engineering. *Ecol Eng.* 2012;41:22–31.
22. Edeline E, Bardonnet A, Bolliet V, Dufour S, Elie P. Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: Effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behaviour. *Horm Behav.* 2005; 48:53–63.
23. Bureau du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnet A. Energy and migratory behaviour in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Physiol Behav.* 2007;92:684–90.
24. Fontaine M. Physiological Mechanisms in the Migration of Marine and Amphihaline Fish. *Advances in Marine Biology.* 1976;13:241–355.
25. Woodhead AD. Endocrine physiology of fish migration. G. Allen and Ungin; 1975.
26. Castonguay M, Dutil J-D, Audet C, Miller R. Locomotor Activity and Concentration of Thyroid Hormones in Migratory and Sedentary Juvenile American Eels. *Trans Am Fish Soc.* 1990;119:946–56.
27. Coppe A, Pujolar JM, Maes GE, Larsen PF, Hansen MM, Bernatchez L, et al. Sequencing, de novo annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered european eel. *BMC Genomics.* 2010;11:635.
28. Sébert P, Mortelette H, Nicolas J, Amérand A, Belhomme M, Moisan C. In vitro aerobic and anaerobic muscle capacities in the European eel, *Anguilla anguilla*: Effects of a swimming session. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;176:118–22.
29. Larsson A, Lewander K. Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1973;44:367–74.
30. Cren L. The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). *J Anim Ecol.* 1951;20:201.
31. Pujolar JM, Marino IAM, Milan M, Coppe A, Maes GE, Capoccioni F, et al. Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel. *BMC Genomics.* 2012;13:507.
32. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:5116–21.
33. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:W17–4.
34. Imbert H, Arrowsmith R, Dufour S, Elie P. Relationships between locomotor behaviour, morphometric characters and thyroid hormone levels give evidence of stage-dependent mechanisms in European eel upstream migration. *Horm Behav.* 2008;53:69–81.
35. Cui Y, Wootton RJ. Effects of ration, temperature and body size on the body composition, energy content and condition of the minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.). *J Fish Biol.* 1988;32:749–64.
36. Edeline E, Lambert P, Rigaud C, Elie P. Effects of body condition and water temperature on *Anguilla anguilla* glass eel migratory behaviour. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2006;331:217–25.
37. Bureau du Colombier S, Lambert P, Bardonnet A. Is feeding behaviour related to glass eel propensity to migrate? *Estuar Coast Shelf Sci.* 2008;80:323–9.
38. Zimmer DB, Eubanks JO, Ramakrishnan D, Criscitiello MF. Evolution of the S100 family of calcium sensor proteins. *Cell Calcium.* 2013;53:170–9.
39. Shang X, Cheng H, Zhou R. Chromosomal mapping, differential origin and evolution of the S100 gene family. *Genet Sel Evol.* 2008;40:449–64.
40. Andressen C, Blumcke I, Celio MR. Calcium-binding proteins: Selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.* 1993;271:181–208.
41. Donato R. Perspectives in S-100 protein biology. *Cell Calcium.* 1991;12:713–26.
42. Donato R. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:637–68.
43. Di Donato V, Auer TO, Duroure K, Del Bene F. Characterization of the Calcium Binding Protein Family in Zebrafish. *PLoS One.* 2013;8:1.
44. Hermann A, Donato R, Weiger TM, Chazin WJ. S100 calcium binding proteins and ion channels. *Front Pharmacol.* 2012;3:67.
45. Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 1998;21:13–26.
46. Heizmann CW. Calcium signaling in the brain. *Acta Neurobiol Exp.* 1993;53:15–23.
47. Jastrzebska B, Filipek A, Nowicka D, Kaczmarek L, Kuznicki J. Calcyclin (S100A6) binding protein (CacyBP) is highly expressed in brain neurons. *J Histochem Cytochem.* 2000;48:1195–202.
48. Nowotny M, Bhattacharya S, Filipek A, Krezel AM, Chazin W, Kuznicki J. Characterization of the interaction of calcyclin (S100A6) and calcyclin-binding protein. *J Biol Chem.* 2000;275:31178–82.
49. Schneider G, Filipek A. S100A6 binding protein and Siah-1 interacting protein (CacyBP/SIP): Spotlight on properties and cellular function. *Amino Acids.* 2011;41:773–80.
50. Lesniak W, Siomnicki iP, Filipek A. S100A6 - New facts and features. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390:1087–92.
51. Li H, Guan HW. Research progress on calcium-binding protein S100A6. *J Dalian Med Univ.* 2012;34:194–9.
52. Gruden MA, Storozheva ZI, Sewell RDE, Kolobov VV, Sherstnev VV. Distinct functional brain regional integration of Casp3, Ascl1 and S100a6 gene expression in spatial memory. *Behav Brain Res.* 2013;252:230–8.
53. He H, Li J, Weng S, Li M, Yu Y. S100A11: Diverse Function and Pathology Corresponding to Different Target Proteins. Totowa, NJ: Etats-Unis: Cell biochemistry and biophysics; 2009.
54. Sakaguchi M, Sonegawa H, Murata H, Kitazoe M, Futami J, Kataoka K, et al. S100A11, an dual mediator for growth regulation of human keratinocytes. *Mol Biol Cell.* 2008;19:78–85.
55. Deloulme JC, Assard N, Mbele GO, Mangin C, Kuwano R, Baudier J. S100A6 and S100A11 are specific targets of the calcium- and zinc-binding S100B protein in vivo. *J Biol Chem.* 2000;275:35302–10.
56. Nishiyama H, Knopfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(6):4037–42.
57. Benfenati F, Ferrari R, Onofri F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100A1 codistributes with synapsin I in discrete brain areas and inhibits the F-actin-bundling activity of synapsin I. *J Neurochem.* 2004;89:1260–70.
58. Ackermann GE, Marenholz I, Wolfer DP, Chan WY, Schäfer B, Erne P, et al. S100A1-deficient male mice exhibit increased exploratory activity and reduced anxiety-related responses. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res.* 2006;1763:1307–19.
59. Tóthová V, Gibadulinová A. S100P, a peculiar member of S100 family of calcium-binding proteins implicated in cancer. *Acta Virol.* 2013;57:238–46.
60. Arumugam T, Simeone DM, Schmidt AM, Logsdon CD. S100P Stimulates Cell Proliferation and Survival via Receptor for Activated Glycation End Products (RAGE). *J Biol Chem.* 2004;279:5059–65.
61. Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signal.* 2013;25:457–69.
62. Garvalov BK, Flynn KC, Neukirchen D, Meyn L, Teusch N, Wu XW, et al. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci.* 2007;27:13117–29.
63. Bradke F, Dotti CG. Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Curr Biol.* 2000;10:1467–70.

64. Sarmiere PD, Bamberg JR. Regulation of the Neuronal Actin Cytoskeleton by ADF/Cofilin. *J Neurobiol*. 2004;58:103–17.
65. Racz B, Weinberg RJ. Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience*. 2006;138:447–56.
66. Rust MB, Gurniak CB, Renner M, Vara H, Morando L, Görlich A, et al. Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J*. 2010;29:1889–902.
67. Yuen EY, Liu W, Kafri T, van Praag H, Yan Z. Regulation of AMPA receptor channels and synaptic plasticity by cofilin phosphatase Slingshot in cortical neurons. *J Physiol*. 2010;588:2361–71.
68. Gu J, Lee CW, Fan Y, Komlos D, Tang X, Sun C, et al. ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nat Neurosci*. 2010;13:1208–15.
69. Eckelhoefer HA, Rajapaksa TE, Wang J, Hamer M, Appleby NC, Ling J, Lo DD. Claudin-4: Functional studies beyond the tight junction. *Methods in Molecular Biology*. 2011;762:115–128.
70. Chua KL, Lim TM. Type I and type II cytokeratin cDNAs from the zebrafish (*Danio rerio*) and expression patterns during early development. *Differentiation*. 2000;66:31–41.
71. Iwatsuki H, Suda M. Transient expression of keratin during neuronal development in the adult rabbit spinal ganglion. *Anat Sci Int*. 2010;85:46–55.
72. Gnegy ME. Ca²⁺/calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. *Crit Rev Neurobiol*. 2000;14:91–129.
73. Delorenzo RJ. Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Fed Proc*. 1982;41:2265–72.
74. Greenberg ME, Thompson MA, Sheng M. Calcium regulation of immediate early gene transcription. *J Physiol Paris*. 1992;86:99–108.
75. Zheng F, Luo Y, Wang H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor-mediated transcription of the immediate early gene *Arc* by intracellular calcium and calmodulin. *J Neurosci Res*. 2009;87:380–92.
76. Davis S, Bozon B, Laroche S. How necessary is the activation of the immediate early gene *zif 268* in synaptic plasticity and learning? *Behav Brain Res*. 2003;142:17–30.
77. Ghosh A, Ginty DD, Bading H, Greenberg ME. Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J Neurobiol*. 1994;25:294–303.
78. Igaz LM, Bekinschtein P, Vianna MMR, Izquierdo I, Medina JH. Gene expression during memory formation. *Neurotox Res*. 2004;6:189–203.
79. Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, Guzowski JF. Networks of neurons, networks of genes: An integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89:269–84.
80. Lanahan A, Worley P. Immediate-Early Genes and Synaptic Function. *Neurobiol Learn Mem*. 1998;70:37–43.
81. Xue GP, Rivero BP, Morris RJ. The surface glycoprotein Thy-1 is excluded from growing axons during development - a study of the expression of Thy-1 during axogenesis in hippocampus and hindbrain. *Development*. 1991;112:161–76.
82. Xue GP, Calvert RA, Morris RJ. Expression of the neuronal surface glycoprotein Thy-1 is under posttranscriptional control, and is spatially regulated in the developing olfactory system. *Development*. 1990;109:851–4.
83. Moullé VS, Cansell C, Luquet S, Cruciani-Guglielmacci C. The multiple roles of Fatty Acid Handling Proteins in brain. *Front Physiol*. 2012;3:385.
84. Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P. Thyroid status is related to migratory behaviour in *Anguilla anguilla* glass eels. *Mar Ecol Prog Ser*. 2004;282:261–70.
85. Tomoda H, Uematsu K. Morphogenesis of the Brain in Larval and Juvenile Japanese Eels, *Anguilla japonica*. *Brain Behav Evol*. 1996;47:33–41.
86. Gonda A, Herczeg G, Merilä J. Population variation in brain size of nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*) - Local adaptation or environmentally induced variation? *BMC Evol Biol*. 2011;11:75.
87. Kihlsinger RL, Lema SC, Nevitt GA. Environmental rearing conditions produce forebrain differences in wild Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2006;145:145–51.
88. von Krogh K, Sørensen C, Nilsson GE, Øverli Ø. Forebrain cell proliferation, behaviour, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiol Behav*. 2010;101:32–9.
89. Gonda A, Välimäki K, Herczeg G, Merilä J. Brain development and predation: Plastic responses depend on evolutionary history. *Biol Lett*. 2012;8:249–52.
90. Salvanes AGV, Moberg O, Ebbesson LOE, Nilsen TO, Jensen KH, Braithwaite VA. Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2013;280:13.
91. Sørensen C, Johansen IB, Overli O. Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;181:25–34.
92. Fay JC, Wittkopp PJ. Evaluating the role of natural selection in the evolution of gene regulation. *Heredity*. 2008;100:191–9.
93. Giger T, Excoffier L, Day PJR, Champigneulle A, Hansen MM, Powell R, et al. Life history shapes gene expression in salmonids. *Curr Biol*. 2006;16:R281–2.
94. Aubin-Horth N, Renn SCP. Genomic reaction norms: Using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Mol Ecol*. 2009;18:3763–80.
95. Derome N, Duchesne P, Bernatchez L. Parallelism in gene transcription among sympatric lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchell) ecotypes. *Mol Ecol*. 2006;15:1239–49.
96. Larsen PF, Nielsen EE, Williams TD, Hemmer-Hansen J, Chipman JK, Kruhöffer M, et al. Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Mol Ecol*. 2007;16:4674–83.
97. Pacariz S, Westerberg H, Björk G. Climate change and passive transport of European eel larvae. *Ecol Freshw Fish*. 2014;23:86–94.
98. Dannewitz J, Maes GE, Johansson L, Wickström H, Volckaert FAM, Järvi T. Panmixia in the European eel: A matter of time. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2005;272:1129–37.
99. Lenormand T. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends Ecol Evol*. 2002;17:183–9.
100. Sultan SE, Spencer HG. Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *Am Nat*. 2002;160:271–83.
101. Edeline E. Adaptive phenotypic plasticity of eel diadromy. *Mar Ecol Prog Ser*. 2007;341:229–32.
102. Côté CL, Castonguay M, Kalujnaia MS, Cramb G, Bernatchez L. In absence of local adaptation, plasticity and spatially varying selection rule: A view from genomic reaction norms in a panmictic species (*Anguilla rostrata*). *BMC Genomics*. 2014;15:403.
103. Ebbesson LOE, Braithwaite VA. Environmental effects on fish neural plasticity and cognition. *J Fish Biol*. 2012;81:2151–74.
104. Oliveira RF. Social plasticity in fish: integrating mechanisms and function. *J Fish Biol*. 2012;81:2127–50.

3. Conclusion Article 1

L'analyse du niveau de transcription de 15000 séquences génétiques réalisée sur trois tissus différents a montré que le foie et le muscle ne présentaient aucune différence significative entre les groupes d'individus provenant des différents segments échantillonnés le long de l'axe du Canal du Porge. Bien que les échantillons musculaires du 3^e segment n'étaient pas disponibles, l'absence de différences au niveau du muscle entre les poissons des deux premiers segments suggère que ni la distance de nage entre les sites ni le type de passe escaladée n'influencent la sollicitation de gènes impliqués entre autres dans les métabolismes aérobies ou anaérobies, qui pourraient nous renseigner sur les capacités de nage des poissons (Garenc *et al.* 1998; Martinez *et al.* 2003).

En revanche, des différences significatives ont été détectées dans le cerveau, en particulier entre les individus échantillonnés à Joncru et ceux du Pas du Bouc. Un lot de 40 séquences génétiques correspondant à 26 gènes uniques a été identifié. Tous ces gènes étaient surexprimés dans le cerveau du groupe d'individus capturés en amont. La fonction commune de la majorité de ces gènes concerne la plasticité synaptique et la neurogenèse. Ces fonctions peuvent être associées aux processus cognitifs tels que l'acquisition de la mémoire spatiale, la perception des nouveaux stimuli ou la prise de décisions.

Ces résultats génèrent des nouvelles questions :

Peu de différences ont été observées entre les individus échantillonnés au pied du premier et deuxième obstacle, généralement cachés dans la végétation ou sous les galets. Les différences les plus fortes concernent le groupe échantillonné lors du moment d'escalade de la passe (au niveau du troisième obstacle). S'agit-il d'une surexpression de gènes liée à l'expression du comportement d'escalade ?

L'échantillonnage, le sacrifice et la dissection de chaque individu ont été réalisés sur place et de manière immédiate et standardisée, ainsi le niveau de transcription des gènes mesuré peut refléter les conditions auxquelles les individus étaient soumis au moment de l'échantillonnage. Cependant, les différents niveaux de transcription pouvaient être présents chez les individus bien avant qu'ils rencontrent les premiers obstacles. Dans ce cas, les obstacles aquatiques agiraient comme filtre écologique sur les phénotypes moléculaires, le passage étant réservé seulement à des individus surexprimant (=sélection d'une norme de réaction particulière) ou capables de surexprimer (=sélection sur la plasticité du trait) les

gènes détectés (Figure 20 B). Alternativement, les niveaux de transcription des gènes d'intérêt seraient influencés (=induction) par le passage par l'obstacle (Figure 20 A). Dans ce cas, le pool d'individus arrivant au pied du barrage pourrait présenter des niveaux de transcription homogènes, et l'augmentation de la transcription des gènes serait induite chez les individus uniquement au moment de leur passage sur l'obstacle.

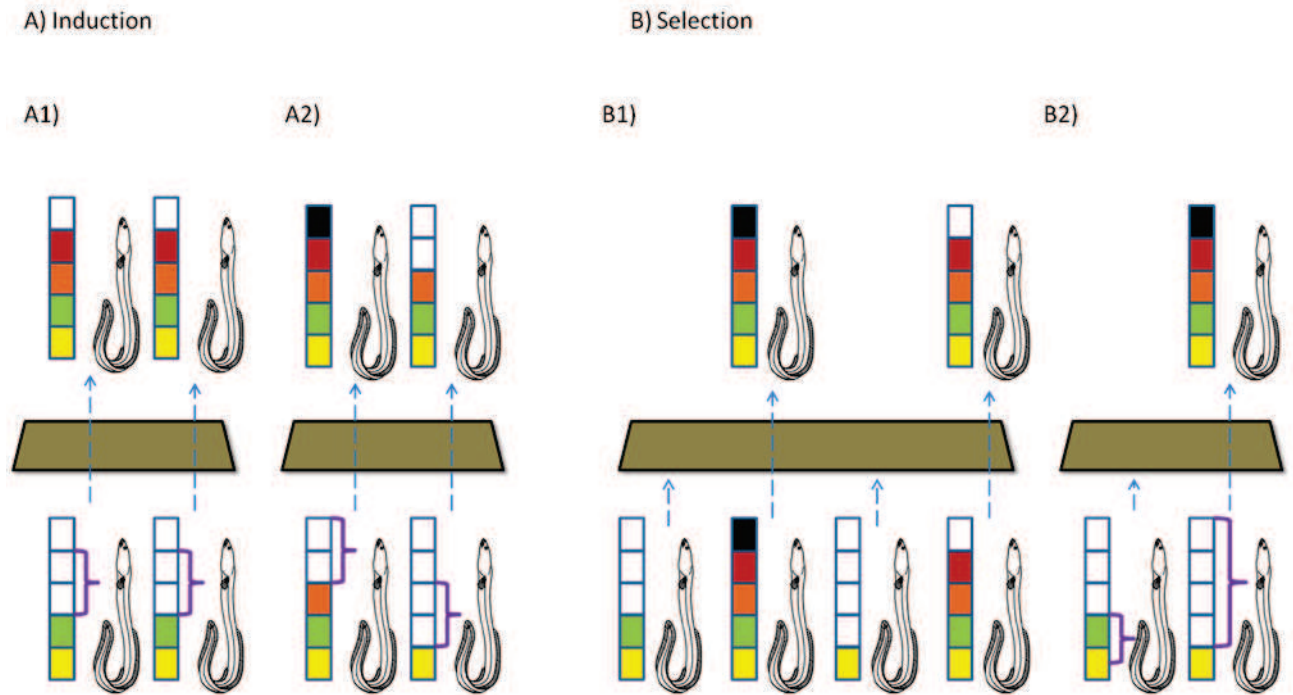


Figure 20) Augmentation du niveau de transcription des gènes induite par les obstacles *via* la plasticité phénotypique à partir d'un pool initial homogène (A1) ou hétérogène (A2) des profils moléculaires. (B) Sélection sur les profils moléculaires préexistants (B1) ou sur la plasticité (flexibilité) phénotypique permettant d'atteindre les normes de réaction plus ou moins larges (B2). Les accolades indiquent la gamme des niveaux de transcription possibles *via* la plasticité (flexibilité) phénotypique. Bien que les cas A1, A2 et B2 font intervenir la plasticité phénotypique, dans le cas de la sélection (B2), la plasticité phénotypique est développementale ou possède une base (epi) génétique qui diffère entre les individus. D'autres cas sont possibles (le niveau de transcription initial homogène, mais la flexibilité phénotypique différente) ne sont pas présentés.

Quelque soit le mécanisme permettant d'expliquer les différences de niveau de transcription, la régulation de l'expression génétique peut être de courte durée ou se maintenir à long terme. Par exemple, dans le cas où la sélection s'opère sur des profils moléculaires préexistants, les niveaux de transcription forts pourraient être maintenus à long terme, voire tout au long de la vie de l'animal. Dans le cas où la sélection s'opère sur la plasticité (flexibilité) phénotypique, seuls les individus aptes à solliciter l'activité des gènes à un certain

niveau pourraient traverser les obstacles. Ensuite, une fois l'obstacle traversé, la transcription des gènes d'intérêt pourrait revenir à un niveau d'activité plus faible. Dans le cas de l'induction également, l'activité des gènes sollicitée sur une courte période pourrait revenir à son niveau initial une fois l'obstacle passé, ou être maintenue au même niveau pour le restant de la vie de l'animal. D'une manière générale, pour déterminer si les différences dans les traits phénotypiques sont le fruit de la flexibilité phénotypique ou ont une base génétique ou épigénétique, nous avons eu recours à des expériences de Common Garden. Lors du Common Garden, les individus exprimant des phénotypes différents ont été maintenus à long terme sous des conditions strictement homogènes. Ainsi, toute composante environnementale susceptible de jouer sur la plasticité phénotypique est la même pour tous les individus. Si les différences phénotypiques persistent à la fin de l'expérience, alors leur origine peut avoir une base génétique ou épigénétique.

CHAPITRE 4 :

Les différences entre les groupes persistent-elles ? :

Common Garden

1. Introduction Article 2

Suite aux résultats de l'étude préliminaire de 2012, un nouvel échantillonnage sur le même axe aquatique a été effectué en 2013. Les mêmes sites ont été prospectés, au pied (en aval) du premier ouvrage (Pas du Bouc), au pied du second ouvrage (Langouarde), et au niveau de la passe à anguilles du troisième ouvrage (Joncru). L'objectif de cette nouvelle étude était de vérifier si les différences entre les groupes amont-aval observées sur les niveaux de transcription des gènes liées, entre autres, à la plasticité synaptique et à la neurogenèse, persisteraient longtemps après le moment de passage par les obstacles. En effet, l'expression des gènes peut être liée à l'acclimatation physiologique ou la plasticité phénotypique (Aubin-Horth & Renn 2009; Giger *et al.* 2006), mais elle est aussi parfois considérée comme indicateur de la divergence adaptative (Derome *et al.* 2006; Larsen *et al.* 2007; Roelofs *et al.* 2009). Dans le cas de notre étude, tous les individus pourraient présenter des profils transcriptomiques préétablis, bien avant qu'ils rencontrent les premiers obstacles. Leurs profils transcriptomiques pourraient aussi être différenciés temporairement ou de manière stable, leur régulation étant déclenchée au moment du franchissement de l'obstacle. La régulation temporelle de l'expression des gènes sera associée ici à la flexibilité ou plasticité phénotypique (Piersma & Drent 2003), la régulation stable dans le temps mais déclenchée par le moment de passage sera associée à la plasticité développementale, alors que les profils préétablis et stables dans le temps à court terme pourraient être liés à des différences génétiques issues de la sélection locale intragenerationnelle.

Afin de vérifier une potentielle persistance des profils transcriptomiques, tous les individus échantillonnés ont été transportés vivants jusqu'à la station d'expérimentation où ils ont été maintenus sous des conditions strictement homogènes pendant deux mois. Cette stabulation à long terme permet de niveler toutes les différences de la composante

environnementale (facteurs biotiques ou abiotiques spécifiques au site d'échantillonnage) qui pourraient influencer l'expression des traits étudiés via la plasticité phénotypique. En effet, l'expérience de Common Garden est couramment utilisée pour tester l'hypothèse de gènes vs environnement comme origine des différences phénotypiques (Dammerman *et al.* 2015; Gonda *et al.* 2011; Hutchings 2011; Juliana & Janzen 2007; Mittelbach *et al.* 1999; Relyea 2002; Thorpe *et al.* 2005) et a déjà été utilisée dans les cas d'étude d'expression génétique chez l'anguille (Côté *et al.* 2009; Côté *et al.* 2015; Pavey *et al.* 2015). Ces derniers travaux chez l'anguille ont permis de rejeter l'hypothèse que la plasticité phénotypique seule pouvait expliquer les différences observées entre les anguilles provenant de différents habitats. Ces différences seraient causées par des différences génétiques provenant de sélection spatialement variable s'exerçant de façon intra-générationnelle.

2. Article 2



Climbing experience in glass eels: A cognitive task or a matter of physical capacities?

T. Podgorniak^a, A. Angelini^a, S. Blanchet^{b,c}, E. de Oliveira^d, F. Pierron^{e,f}, F. Daverat^a

^{13.} Irstea Bordeaux, UR EABX, HYNES (Irstea – EDF R&D), 50 avenue de Verdun, Cestas 33612 Cedex, France

^{14.} Station d'écologie Expérimentale du CNRS à Moulis, USR 2936, 09 200 Moulis, France

^{15.} CNRS, UPS, ENFA, Évolution & Diversité Biologique (EDB) UMR 5174, 118 Route de Narbonne, Toulouse 31062 Cedex 9, France

^{16.} EDF R&D LNHE, HYNES (Irstea–EDF R&D), 6, quai Watier, Bat Q, Chatou 78400, France

^{17.} Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

^{18.} CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

HIGHLIGHTS

- We studied phenotypic traits of eels climbing water obstacles.
- The analysis included muscle enzymatic activity and genes transcription in brain.
- Experienced fish up regulated genes associated with synapse and neurogenesis.
- Climbing water obstacles can implicate cognition-related traits in migrating fish.

article info

Article history:

Received 7 July 2015

Received in revised form 28 July 2015

Accepted 1 August 2015

Available online 8 August 2015

Keywords:

Eel dams

Migration

Muscle

Brain

Cognition

abstract

The European eel is a panmictic species, whose decline has been recorded since the last 30 years. Among human-induced environmental factors of decline, the impact of water dams during species migration is questioned. In-deed, water impoundments can be a severe obstacle for young eels trying to reach the upstream freshwater zones, even if they are equipped with fish-friendly passes. The passage by such devices could be an important event shaping the outcome of the future life and life history traits of eels. We studied what phenotypic traits were associated with the event of experience of passage by water obstacles. We analyzed specific enzyme activities and/or gene transcription levels in the muscle and brain to test whether the obstacle passage is rather a physical or cognitive task. We found that after a long period of maintenance under homogenous conditions, transcription levels of several genes linked to synaptic plasticity, neurogenesis and thyroid activity differed among the field-experience groups. In contrast, muscle gene transcription levels or enzymatic activities did not show any differences among fish groups. We suggest that cognitive processes such as learning and memory acquisition rather than swimming-related metabolic capacities are involved in passage of water obstacles by young eels.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Anthropogenic activities are often associated with landscape restructuration for economic purposes. In aquatic ecosystems, landscape modifications involve the construction of water barriers such as weirs and dams. These changes strongly alter the longitudinal connectivity of water corridors and can negatively impact aquatic organisms [1–2]. Movements of migratory species are constrained by aquatic barriers, restricting their access to feeding or reproductive habitats [3–4]. Aquatic barriers can prevent the recruitment of fish into upstream freshwater habitats [5], hence forcing them to settle in the most

downstream parts at high densities. Depending on the type and height of the barriers, environmental conditions and species physiology and behaviour, obstacles may be impassable. Even though barriers are passable, they can delay migration [6], which in turn can lead to suboptimal colonization and modify life-history traits of animals and in fine impair reproductive capacity of genitors [7–8].

Many efforts have been undertaken to ease the passage of obstacles by installing fish-friendly devices such as fishways. However, even if equipped with fish passes, barriers still have an impact on fish passing through. Indeed, beyond quantitative effects being widely addressed in the literature [9], aquatic barriers could also have qualitative effects. Fish passage by fishway involves energy expenditure needed to find the entrance [10], especially when the fishway attractiveness is poor [11–12], and to ascend such devices. In addition, the ascension is often

Corresponding author.

E-mail address: tomasz.podgorniak@irstea.fr (T. Podgorniak).

performed under harsh hydraulic conditions [13–14]. In this case, inter-individual variation in phenotypic traits at the intra-specific level could play an important role in the success of passage of animals through fish-ways. Among other traits, the capacity of individuals to perceive environmental cues as well as their overall activity could play an important role in their capacity to find the fishway [15]. The success of crossing the fishway could be also associated with the physiological status or swimming capacity of fish [9,16], and the fishway device could hence act as a selective filter or contribute to the modification of fish biology, physiology and behaviour.

The impact of fishway passage on individual phenotypic traits can be particularly important in species with high phenotypic plasticity i.e. with a potential for environmentally induced wide range of reaction norms. One of the fish species with the widest range of variation in phenotypic traits is the European eel *Anguilla anguilla* [17–18]. The European eel is a catadromous species occurring in inland and estuarine ecosystems throughout Europe. It has a complex life cycle requiring two transatlantic migrations. The first migration from the Sargasso Sea, the unique spawning ground of the species, is done by a passive transport of leptocephali larvae towards the European continental shelf [19–20]. Once reached, the metamorphosis of leptocephali into glass eels occurs, and the colonization of continental waters can begin. Many young eels migrate upstream in search of optimal growth habitats to settle down as elvers or yellow eels.

Over the last 30 years, the European eel population has markedly declined throughout its whole repartition area and is considered as 'critically endangered' [21]. Many causes have been proposed (overfishing, man-introduced parasites and diseases, pollution, climate change), although the impact of anthropogenic barriers at both ontogenetic stages of fish (i.e. increased mortality during passage by hydropower plants in the case of spawning migration of silver eels, non-optimal access to freshwater habitats together with density dependent predation during glass eel upstream migration) has been suggested as one of the key factors contributing to the sharp decline of the European eel populations [22]. For eel species, the most efficient fish pass is ladder-type, based on a natural rheotaxis and climbing tendency of young eels. Yet, the efficiency of such fishways has been assessed only from a quantitative point of view. Currently, data are mainly restricted to the proportions of fish approaching the device and of those succeeding to pass the obstacle [8,23].

Our study aimed at testing whether phenotypic variation of specific traits in glass eels can be associated with their experiential differences in passing water obstacles. We investigated whether fish with different climbing experiences acquired in the field express differences in phenotypic traits after a common garden period. We previously showed that brain gene expression was related to different behaviours of fishway passage during in situ investigations [30]. However, these differences were observed in fish directly analyzed after field sampling, thus preventing the detection of delayed and long-term impacts on fish. In the present study, we aimed at expanding these preliminary findings by assessing the relative long-term impacts of obstacle crossing on cognitive abilities, often associated with exploratory behaviour [24–25] in contrast to swimming performances [26–27]. Moreover, thyroid metabolism and body condition were assessed, as they were suggested to play a role in glass eel freshwater migration [28–29]. We therefore investigated differences in the gene transcription level and in vitro enzyme activity in two tissues – the brain and the muscle.

2. Material & methods

All procedures used in this study were approved by the Aquitaine fish-birds ethic committee (a committee approved and registered by the French Ministry of Higher Education and Research under number 73).

2.1. Sampling

Eels were collected using electric fishing during two consecutive days (16–17 of July 2013) under similar climatic and hydrological conditions in the Canal des Etangs, an artificial freshwater corridor in South-Western France (44.75–44.95 N, 1.1–1.2 W). The river line is linear, whereas the water flow remains homogenous and controlled by a series of weirs. Three successive low-distanced obstacles were built along the river length, all equipped with a fish pass delimiting three successive river segments. The most downstream dam is equipped with a glass eel-specific pass, and the two other are equipped with an eel pass (Fig. 1). Thirty individuals were sampled from each of three sites, according to their body size (between 67 and 98 mm) and health status (no externally visible pathogens). By sampling three linear dammed sites, we ensure that certain fish have already expressed different climbing behaviours in the field (with expectedly no climbing event, one climbing event or two climbing events, hereafter labeled respectively as 0C, 1C and 2C). In the two most downstream segments (i.e. 0C and 1C), individuals were sampled below the obstacle, close to the fishway entry. Fish from the most upstream segment (2C) were sampled directly on the fishway slope, as water depth below the obstacle precluded the use of electric fishing. All fish were brought alive to the laboratory for the common garden experiment.

2.2. Common garden

After a prophylactic treatment (H_2O_2 , 250 ppm, 60 min), eels were individually marked by inserting a 6 mm long RFID device (NONATEC, Lutronics) in the peritoneal cavity. Tagging was undertaken under fish anesthesia (eugenol). After one week recovery, all the fish were placed into the same tank and reared for two months at low density (1 fish/100 L) in the same controlled conditions of light, food, temperature and water flow ($T = 22^\circ C$, pH = 6, 12/12 h light cycle, feed with *Chironomidae* ad libitum). After this period, body weight and body length were measured and monthly growth rates were calculated. Then, fish were sacrificed by severing the medulla oblongata. The whole brain and a sample of muscle were dissected and stored in RNeasy lysis buffer (Qiagen) for gene transcription analyses. Additional samples of muscle were dissected and stored in liquid nitrogen for further enzymatic activity analyses.

2.3. Gene transcription analysis

Gene sequences were chosen to specifically target the cognitive function, thyroid activity and aromatase activity in the brain and the swimming capacity of fish muscle (Table 1). A total of 9 genes are associated with neurogenesis and synaptic plasticity, both involved in cognitive processes such as perception, learning and memorization [25,30]: Glutamate receptor ionotropic, NMDA1 (*grin1*), c-Jun (*jun*), cofilin-1 (*cfl1*), CREB binding protein (*crebbp*), Thy-1 membrane glycoprotein (*thy1*), disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (*adam10*), protein S100B (*s100b*), glutamate receptor 3 (*gria3*), and neurogenic differentiation factor 1 (*neurod1*). The gene of iodothyronine deiodinase 2 (*dio2*) was chosen due to its implication in thyroid hormone metabolism, and the gene of aromatase (*cyp19a1*) due to its involvement in neurogenesis [31] and brain sexualization [32]. Concerning muscle analyses, aerobic and anaerobic metabolic pathways were targeted and both gene transcription levels and enzymatic activities of lactate dehydrogenase (gene = *ldh*/enzyme = LDH), citrate synthase (*cs*/CS), cytochrome c oxidase (*cc*/CCO) and pyruvate kinase (*pk*/PK) were analyzed (Table 1). The type of metabolic activity provides insights into physiological performance of fish during two swimming modes: cruise swimming and burst swimming [27,33].

For each gene, specific primer pairs were designed using the EelBase [34] and the Primer3Plus software [35] and were purchased from Sigma Aldrich. All primer pairs are reported in Table 1. Samples

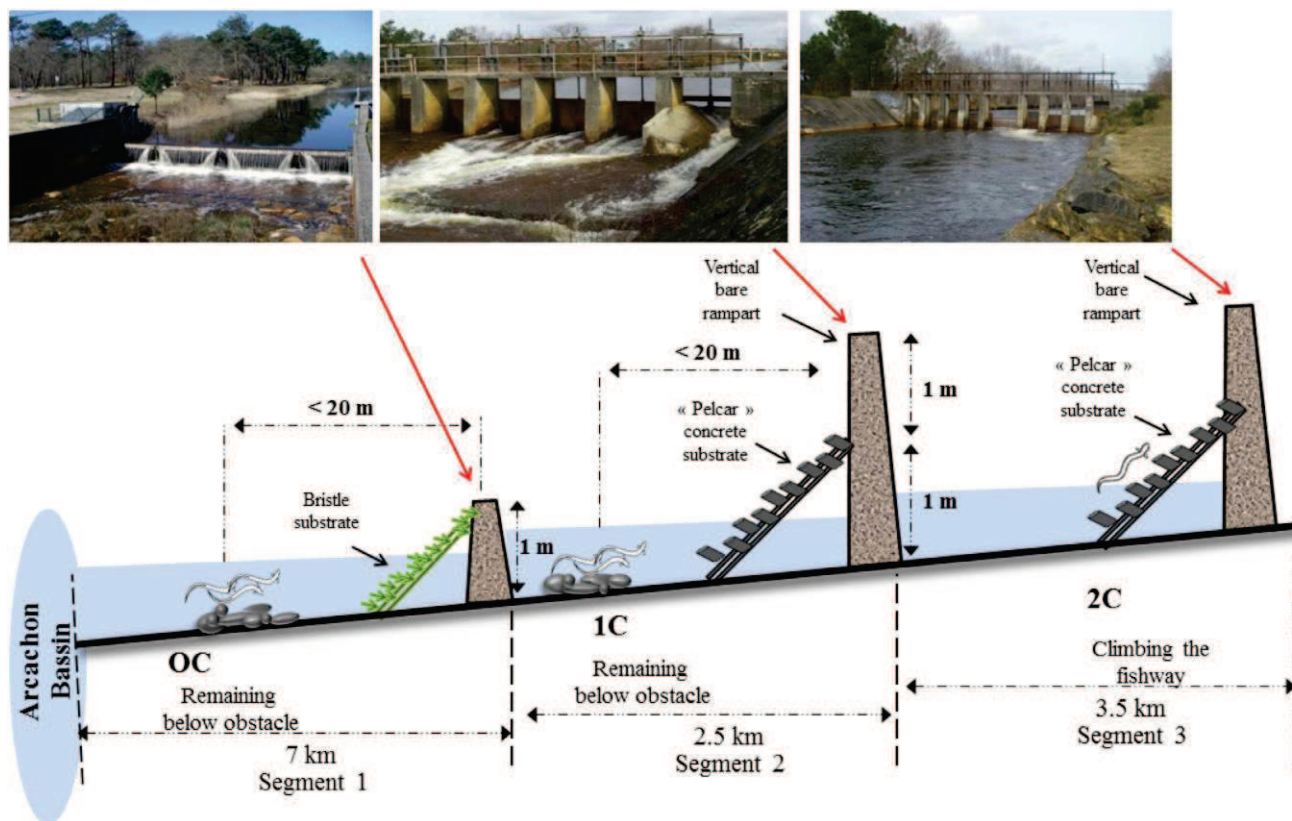


Fig. 1. Sampling site characteristics. The height and the type of fishway in the first segment are different from the two upstream segments. Fish from the first two segments (OC and 1C) were caught below the water obstacle, whereas the fish from the third segment (2C) were caught while climbing the fishway.

Table 1

Primer pairs used for RT-qPCR analyses (a = forward, b = reverse). A total of 11 genes were chosen for brain analysis: *grin1*, *jun*, *cfl1*, *crebbp*, *neurod1*, *thy1*, *adam10*, *s100b*, *gria3*, *cyp19a1*, and *dio2*. A total of 4 genes were selected for muscle analysis: *ldhb*, *pk*, *cs* and *cco*. β -Actin was chosen as reference gene.

Gene name	Sequence 5' to 3'	Function	BLAST hit name	Species	E-value
<i>gria3</i>	CCAGCAAACACCCAGAATTa AATTCCTGTCCTGTCCTCGb	Brain: synapse	CAD60809.1 GI:27802719	Danio rerio	5e-37
<i>grin1</i>	CTGAGCTTCCTCCACAAAGGa CTGGCTACAGTGACCCCAATb	Brain: synapse	XM_010772966.1 GI:736190489	Notothenia coriiceps	2e-163
<i>jun</i>	GATTCGACGTTACGGTTTta TGTGGTTGACGCATTTCATTb	Brain: synapse	JN257262.1 GI:357595814	Carassius auratus	0.0
<i>crebbp</i>	GAAGTGGATGCTGTCACAGTa CCTTCCCGTACAGAACCAAb	Brain: synapse	XM_010889456.1 GI:742179578	Esox lucius	0.0
<i>adam10</i>	AGACGCAAGTCTGCCTCAATa CGCAGTAGCCCTTAAAGTCGb	Brain: synapse	XM_011607642.1 GI:768930177	Takifugu rubripes	0.0
<i>s100b</i>	CGTGGCTGGTCTTAAATGTa CCTCCACTCTCCTCAACTGcb	Brain: synapse	XM_008285887.1 GI:657560810	Stegastes partitus	5e-42
<i>cfl2</i>	TCCACCACAGAGTTTGGTCAa TGTCATCTGGTCAGCTCTGGb	Brain: synapse	NP_998804.1 GI:47174751	Danio rerio	5e-29
<i>thy1</i>	GCACTCCACTGCTTCACAAa GTAACCTTGGTGGGAAAb	Brain: synapse	NP_932331.1 GI:37620192	Danio rerio	9e-14
<i>dio2</i>	TGCGGTGCTTCTGTACTTTGa CAGGACAGGCGATGAGTGTAb	Brain: thyroid activity	AB199797.1 GI:83758433	Anguilla japonica	0.0
<i>neurod1</i>	ACGAAGGCTCGTGTCTTAAa TACAATGGACAGCTCCCAAb	Brain: synapse	NP_001133280.1 GI:213514432	Salmo salar	5e-15
<i>cyp19a1</i>	GAGGAGATCGTGATGGAAGCa ACTTGTCTGATCGGCTCCAGb	Brain: synapse, sex	KF990052.1 GI:595583444	Anguilla anguilla	0.0
<i>ldhb</i>	GGGCACATTACGCTCTTAAa AAGAGCAGTGGCAGTGTGTb	Muscle: anaerobiosis	Q9YGL2.3 GI:17433151	Anguilla rostrata	2e-109
<i>pk</i>	TCTGTGTGGCAGAGTGATTa TTCGATGAGATCATGGATGcb	Muscle: (an)aerobiosis	NM_001140489.1 GI:213513313	Salmo salar	0.0
<i>cs</i>	GCATGTTGGTGAAGTTGTGga GGCCAAAGTACTGGGAGTTCAb	Muscle: aerobiosis	XP_642824.1 GI:66818329	Dictyostelium discoideum	6e-87
<i>cco</i>	TAGAGGCCGGAGCTGGa GGGGAGTTTGGTACTGTGTAATb	Muscle: aerobiosis	KM286458.1 GI:697736614	Anguilla anguilla	0.0
β -actin	CAGCCTTCCTTCTGGGTa AGTATTTCGCTCGGGTb	Housekeeping gene	DQ286836.1 GI:82798415	Anguilla anguilla	0.0

of the brain and muscle were homogenized by means of a bead mill homogenizer (45 s at 3000 oscillations per s, Mixer Mill MM 200, Retsch). Total RNAs were extracted using the SV Total RNA Isolation System (Promega) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined using NanoDrop spectrophotometry. The gene transcription level was measured by quantitative real-time Reverse Transcribed-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR), using the β -actin gene as reference. Amplification of cDNA was monitored using the DNA intercalating dye SyberGreen. Real-time PCR reactions were performed in a MX3000P (Stratagene) following the manufacturer's instructions (one cycle at 95 °C for 10 min, and 40 amplification cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s). Reaction specificity was determined for each reaction from the dissociation curve of the PCR product and by electrophoresis. Relative quantification of each gene transcription level was normalized according to the β -actin gene transcription. Hence, during our experiment, total RNAs were quantified and a same quantity was used for reverse-transcription. During the subsequent qPCR amplifications, the output cycle corresponding to β -actin was examined. This output was always obtained around the same output cycle and no significant variations were observed among conditions, demonstrating the relevance of β -actin as a reference gene in our conditions.

2.4. Enzymatic analyses

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Muscle samples were thawed on ice, chopped with a surgical steel razor blade, weighted and homogenized in ice-cold buffer (pH 7.5; 20 mM HEPES; 1 mM EDTA; 0.1% Triton X-100) (1:50, w/v) using a tissue homogenizer for 30 s (Mixer Mill MM 200, Retsch). Enzyme assays were performed at 20 °C using an ultraviolet and visible (UV/vis) spectrophotometer microplate reader (Epoch, Biotek). The total assay volume was 200 μ L (including 10 μ L of homogenate) and homogenate dilution factors were 25 for CS (citrate synthase), 1000 for LDH (lactate dehydrogenase), 200 for PK (pyruvate kinase) and 75 for CCO (cytochrome c oxidase). Reaction rates were assayed at 412 nm for CS, 550 nm for CCO and 340 nm for LDH and PK. Reactions were measured for 5 min and a linear portion of at least 3 min was used to calculate reaction rates. Reaction conditions for the various enzymes were as follows:

- CS (EC 2.3.3.1): Phosphate buffer (100 mM, pH 8.0), Tris–HCl (100 mM), dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) (0.1 mM), acetyl CoA (0.4 mM), and oxaloacetate (0.45 mM);
- LDH (EC 1.1.1.27): Phosphate buffer (100 mM, pH 7.0), β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NADH) (0.16 mM), and pyruvate (2 mM) (omitted in controls);
- PK (EC 2.7.1.40): Imidazole buffer (imidazole 50 mM, $MgCl_2$ 20 mM, KCl 70 mM, pH 7.5), β -NADH (0.16 mM), adenosine diphosphate (ADP) 15 mM, phosphoenolpyruvate (PEP) (7.5 mM), and LDH in excess;
- CCO (EC 1.9.3.1): Phosphate buffer (100 mM, pH 7.0), cytochrome c (0.07 mM), and 0.33% potassium ferricyanide in blanks.

All assays were run in triplicate and the specific activities are expressed in IU (μ mol of substrate converted to product per min) per g of muscle (wet weight). Protein concentrations were determined using the Lowry method [36].

2.5. Statistical analyses

Comparisons among (ANOVA) or between (t-test) fish groups from different river sections (0C, 1C, 2C) were performed after testing the assumptions of normality (Shapiro–Wilk test) and homoscedasticity (Bartlett test) of the error terms. When assumptions were not met, the non-parametric Kruskal–Wallis test was applied. If significant

effects were detected, Tukey HSD or Wilcoxon tests were used to determine whether means or medians significantly varied between pairs of samples. For all the statistical results, a probability of $p \leq 0.05$ was considered significant.

For each analysis, measurements of fish body mass and length, brain somatic index, brain total RNA concentration ($ng \cdot g^{-1}$, ww), relative body condition (Kn), gene transcription levels, total protein concentration and enzymatic activities were compared among fish groups.

3. Results

3.1. Fish growth

No difference in body length among field groups was observed before (77 ± 6.8 mm, $\chi^2 = 5.749$, $df = 2$, $p = 0.056$) or after (89.29 ± 10.8 mm, $\chi^2 = 1.473$, $df = 2$, $p = 0.479$) the experiment. After the common garden experiment, the growth rate of animals in terms of body length varied significantly among groups ($F = 5.836$, $df = 2$; 74 , $p = 0.004$), with the growth rate of fish from the 2C group being significantly lower than that of the two other groups (Fig. 2). No significant differences among groups were observed regarding the brain somatic index (BSI) and the body condition factor of animals (data not shown).

3.2. Eel brain gene transcription analyses

After two months of common garden experiment, the transcription level of 4 genes (cyp19a1, jun, thy1, dio2) was significantly higher in fish that experienced two climbing events in the field (2C) compared to fish that had never climbed in the field (0C) (Fig. 3). Three out of these four genes (cyp19a1, thy1, dio2) and an additional gene (cfl1) were significantly over-transcribed in fish from the 1C group than those from the 0C group. Thus, a general pattern of an increasing transcription level of genes in the brain was found in fish with at least one climbing experience acquired in the field.

3.3. Interaction of detected genes

Four out of the five genes with higher transcription levels in the climbing-experienced fish group were linked using GeneMANIA (<http://www.genemania.org>) either by co-expression, shared protein domain or physical interactions (Fig. 4). These associations between jun, thy1, cfl1 and dio2 were indirect, and involved many other genes.

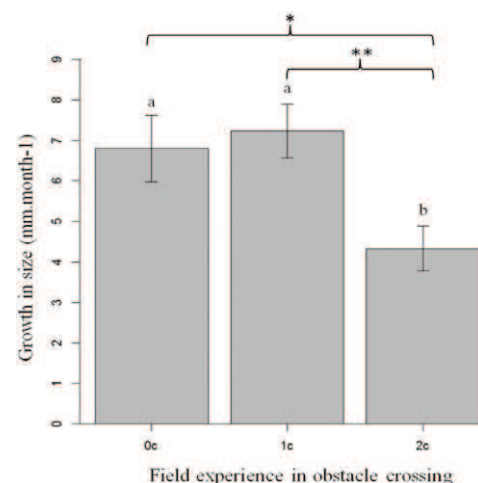


Fig. 2. Mean growth rates (length (t2) – length (t1) / time lapse) of young eels that experienced different climbing events in the field (0C, 1C, 2C), after a two month period of common garden. Bars sharing same-case letters do not differ significantly (Tukey tests, $p \leq 0.05$). Significance level of p value is indicated with asterisk (0.001 b^{**} b^{*} $b^{0.05}$). Total number of fish: 0C = 21, 1C = 26, and 2C = 29.

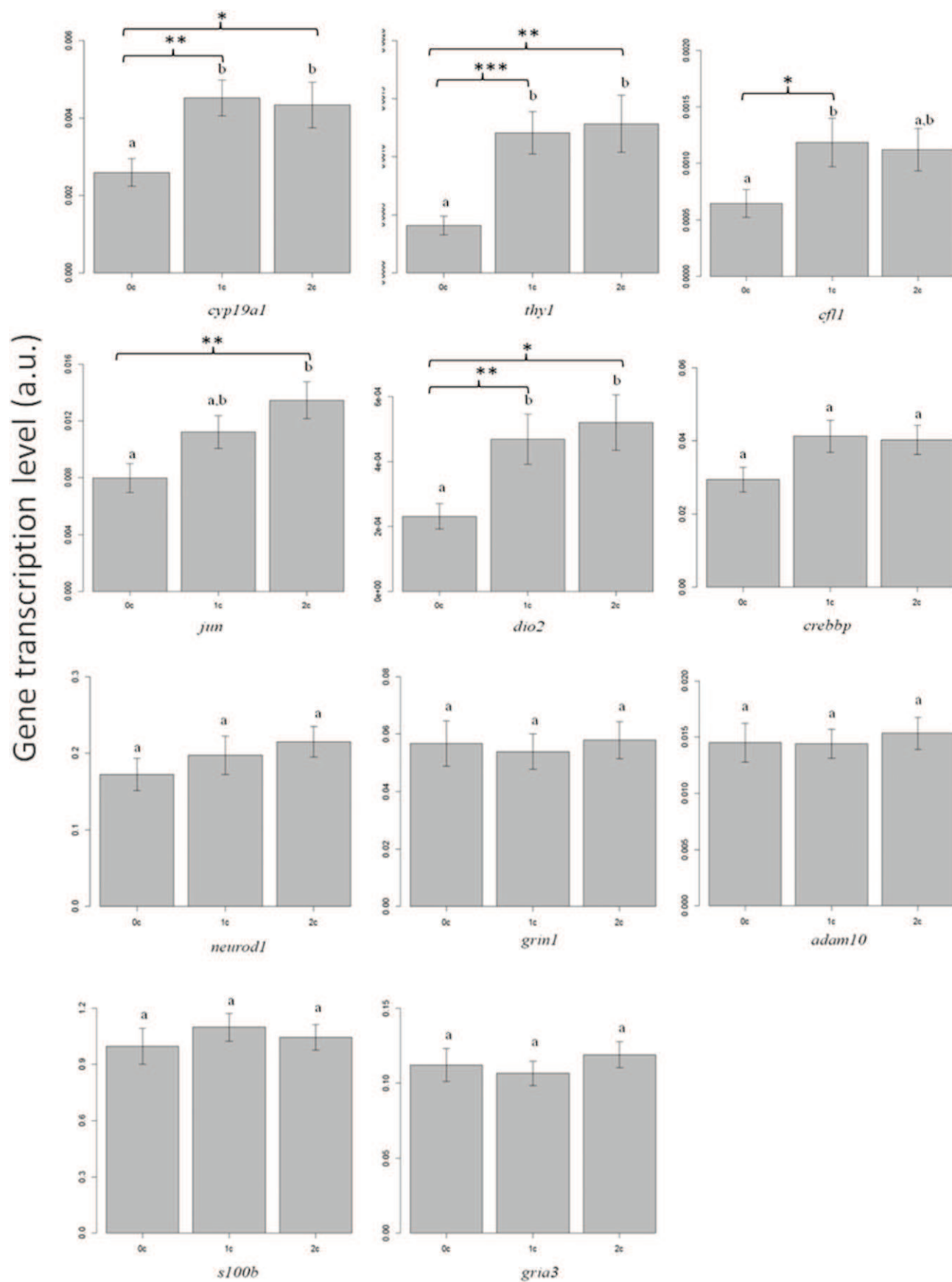


Fig. 3. Transcription level of genes in brain of all young eels sampled along a river on three successive forebays (0C, 1C, 2C) separated by dams after a two month period of common garden. For each gene independently, bars sharing same-case letters do not differ significantly ($p \geq 0.05$). Significance level of p value is indicated with asterisk (** $b < 0.001$ $b < 0.01$ $b < 0.05$). Total number of fish: 0C = 21, 1C = 26, and 2C = 29.

It is noteworthy that *jun*, *thyl* and *cfl1* were chosen for analysis according to their similar biological function, i.e. for their involvement in synaptic plasticity and neurogenesis. *cyp19a1* was not linked to any of these genes according to GeneMANIA prediction server.

3.4. Eel muscle gene transcription analyses and enzymatic activities

No differences were observed among the fish groups on the enzymatic activities and neither on the transcription levels of enzyme-related genes measured in muscle tissue (Table 2). However, the total protein concentration in the muscle of fish from the first (0C) field group was higher in comparison to fish from the second (1C) group.

4. Discussion

4.1. Importance of the brain tissue in crossing water obstacles

At the end of a two-month period of stabulation under homogenous conditions, several differences in gene transcription levels were observed among groups of fish with different climbing experiences in the field. However, these differences concerned only the brain tissue. Neither gene transcription levels nor enzymatic activities in muscle allowed discriminating fish with different experiences of obstacle cross-ing, indicating that this ecological event does not necessarily imply specific swimming performance traits such as muscle metabolic capacities of fish.

Experienced eel climbers (i.e. fish that experienced at least one obstacle passage) presented higher levels of transcription of neural plasticity related genes such as *thyl*, *jun*, and *cfl1*. *THY-1* is related to the development of the neural system involved in olfaction in mice [36] and vision in rats [37]. *C-JUN* is closely related to synaptic plasticity, and is involved in memory formation and learning [38–39]. *C-JUN* belongs to the IEG (Early Immediate Gene) family which is among the first to be regulated in response to environmental stimuli [40]. This group is involved in long-term potentiation (LTP) and in the establishment of long-term memory that requires rapid de novo synthesis of

Table 2

Mean and standard error of total protein concentration (μg of proteins per g of muscle, ww), enzymatic activities ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, ww), transcription levels (a.u.) of genes encoding for *ldhb*, *cco1*, *cs*, and *pk*, as well as the ratio of LDH/CS (enzymatic activities and transcription level) in muscle of young eels sampled along a river on three successive forebays (0C, 1C, 2C) separated by dams after a two month period of common garden. Means designed with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

Variable/site	0C	1C	2C
	Mean \pm se	Mean \pm se	Mean \pm se
Total protein concentration	0.31 \pm 0.07 (a)	0.23 \pm 0.05 (b)	0.26 \pm 0.06 (a, b)
PK activity	525.74 \pm 156.37	535.29 \pm 150.91	521.24 \pm 156.4
LDH activity	973.59 \pm 341.21	1144.97 \pm 230.51	1094.07 \pm 343.29
CS activity	10.17 \pm 3.07	9.11 \pm 3.6	10.08 \pm 2.8
CCO activity	6.26 \pm 5.59	5.14 \pm 1.33	6.68 \pm 5.45
LDH/CS ratio [enzyme]	99.9 \pm 36.52	141.04 \pm 56.45	114.33 \pm 40.87
<i>ldhb</i> transcription level	0.53 \pm 0.24	0.59 \pm 0.23	0.67 \pm 0.37
<i>cs</i> transcription level	0.75 \pm 0.44	0.87 \pm 0.46	1.04 \pm 0.78
<i>cco1</i> transcription level	29.26 \pm 18.03	32.14 \pm 17.41	44.3 \pm 28.11
<i>ldh/cs</i> ratio [RNA]	0.84 \pm 0.46	0.83 \pm 0.47	1.01 \pm 1.13

proteins [41]. Another gene that showed different transcription levels among groups was *cfl1*, encoding for cofilin-1. Cofilin-1 is a protein regulated by NMDA receptors [42] and involved in neural plasticity by regulating the number and the shape of dendritic spines and synapses [43–44]. Cofilin-1 is implicated in spatial and associative learning and memory, as it has been found in rats and mice [45]. Higher transcription levels of this gene were detected in mature European eels when compared to immature individuals [46]. Moreover, overexpression of *cfl1* and *thyl* was also found in a similar group of individuals in the previous study [30]. In the present study, increased transcription levels of *cfl1* were observed in the fish groups that crossed at least one obstacle. Altogether, these genes suggest that cognitive function of the brain (memory acquisition, spatial learning) could be implicated during obstacle

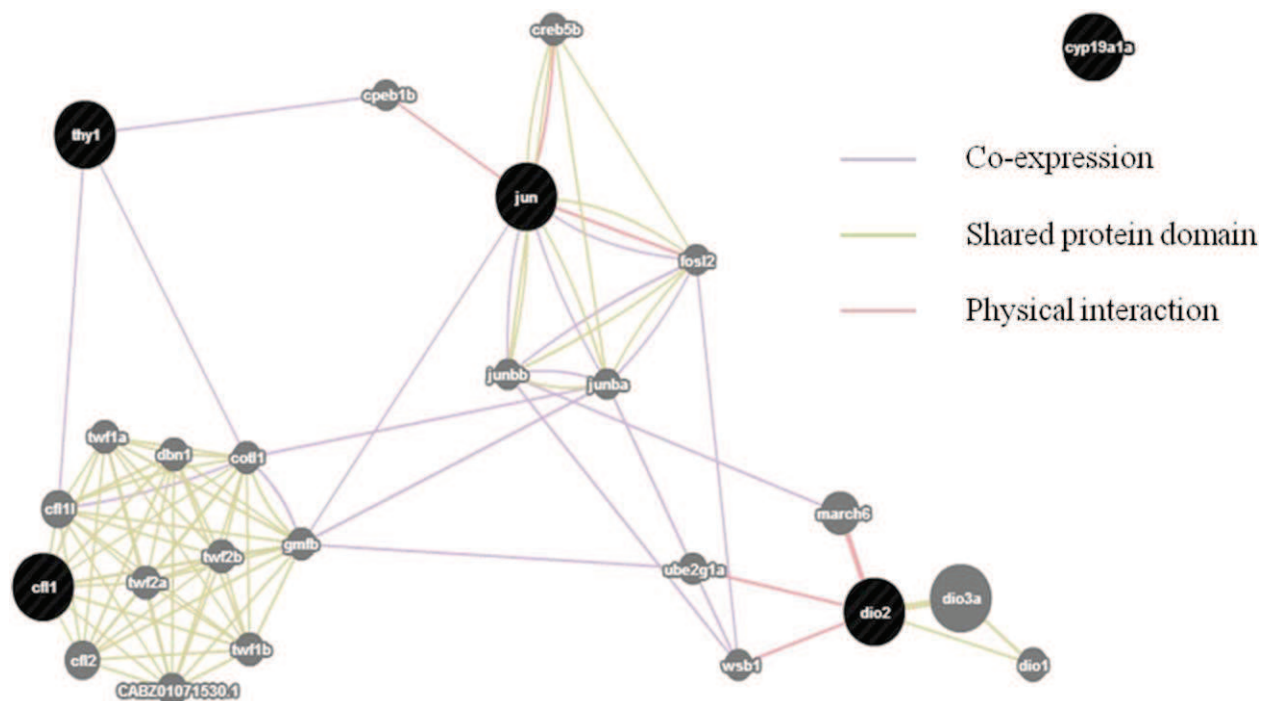


Fig. 4. Existing links among genes with higher transcription levels found in the groups of fish with obstacle crossing experience. Four out of the five genes were found to be indirectly linked: *thyl*, *jun*, *cfl1* and *dio2*, either by co-expression, physical interaction or shared protein domain. Interaction networks were found using GeneMANIA prediction server. The length of the link is proportional to the importance it gives to construct the whole network.

crossing in the field. Indeed, successful passage of obstacles could involve different adjustments of behaviour. In the field, each obstacle crossing is a different task, due to different turbulences, water current intensities, social interactions, predatory presence or steepness and rigidity of the climbed slope. Therefore, it could require from the fish a high behavioural flexibility, related to better perception of environmental stimuli and their use in decision-making processes [47]. Compared to obstacle-naïve fish, experienced climbers showed differences in gene transcription levels even after two months of common garden, implying that experiences acquired in the field had long-lasting effects on gene expression.

Another gene with a higher level of transcription displayed by experienced climbers was *dio2*, encoding for iodothyronine deiodinase 2 (DIO2). DIO2 is an enzyme responsible for the deiodination of the thyroxine (T4) hormone into its biologically active form, the 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3). Our results corroborate with the general consensus that thyroid activity is an important factor explaining the propensity to migrate in glass eels [29]. High levels of T3 and T4 hormones were shown to be associated with migratory behaviour [48–49]. An experimental study demonstrated that eels expressing upstream climbing behavior presented higher levels of T4 and T3 hormones in the body [50]. Moreover, wild eels caught while climbing waterfalls had also higher T4 plasma levels and locomotory activity compared to sedentary individuals [51]. Thyroid hormones have a variety of functions in living organisms, from metabolism regulation to neurogenesis [52]. In addition, high thyroid activity was suggested to correlate with higher caloric status in teleosts [53] and more specifically with higher body condition [49]. This is consistent with our results showing that 2C fish had lower growth rate in size and in accordance with a physiological trade-off where thyroid activity enhances energy allocation to migratory activity (i.e. swimming against the water current, climbing) in detriment to body growth.

Another gene with a higher transcription level in the experienced climbers was the *cyp19a1* gene, encoding for aromatase. Aromatase can play a role in neurogenesis and brain sexualization [31,54]. This is in agreement with the general statement of female-biased proportions encountered in upstream freshwater zones. However, gene transcription data in glass eels and young elvers are not sufficient to suggest an effect of dam passage on eel sexualization. On the other hand, involvement of aromatase in neurogenesis – a function also implicating other differentially regulated genes – reinforces the hypothesis of obstacle-induced changes in neural activity of the brain rather than metabolic capacities of muscle in eels.

Putting these results together we hypothesize that cognitive function of the brain (memory acquisition, spatial learning) could be implicated during obstacle crossing in the field. Several genes related to neural activity and synaptic plasticity were highly expressed in fish that experienced one or two obstacles crossing in the field. Links between activity of genes involved in synapse remodeling or neurogenesis and cognitive capacities have been found in many different organisms [55–56] including fish [57–58], rats [59] or humans [60] and most of them concern physical activity [61–62] or environmental enrichment [63] as a crucial factor increasing cognition-related traits. Alternatively, changes in gene transcription levels could be associated with ontogenetic changes and brain development of glass eels. As crossing the obstacle could be time-consuming, eels from the most upstream segment could be older than the downstream group. At a certain stage, they could engage in a period of higher brain development and morphogenesis of a particular brain region. For example, juvenile eels have larger relative volumes of chemo- and mechanosensory regions of the brain than leptocephalus larvae [64]. These age- or stage-related changes could potentially involve the function of neurogenesis and synaptic plasticity, and energy re-allocation necessary for brain development could partly explain the lowest growth rates of the upstream group of fish. Little is known, however, how and which genes are regulated during this process, and whether there exists any size- or age-threshold for a specific brain region development within the age and

size range of the studied fish. Moreover, otolithometric measurements from the previous study on the same size-range eels didn't show any significant age differences among the fish groups [30], which makes this hypothesis less likely.

4.2. Fishway passage experience and phenotypic traits

An increased gene transcription level is presented here as a consequence of obstacle passage in the field. In other words, we would suggest that the transcription levels of these genes were related to the experience or event of obstacle crossing rather than to the intrinsic propensity to climb displayed by each fish long before they meet any obstacle. However, even if sampling occurred at the end of the migration peak, we cannot rule out the hypothesis that a part of the fish sampled below the first obstacle, i.e. individuals with no climbing experience (0C), were individuals presenting a high propensity to climb, but lacked time to pass the fishway. Determining whether differences in the transcription level are induced by the obstacle crossing or whether aquatic obstacles act as selective pressure for specific but already existing molecular phenotypes can be ecologically meaningful. Indeed, water obstacles could be represented respectively as an element of habitat enrichment or heterogeneity generating different molecular phenotypes via phenotypic plasticity (environment \times gene interaction), or as a factor contributing to selective repartition of different genotypes. While several studies on European eels considered the local adaptation hypothesis as less likely, all the more so because of random mating and the absence of habitat choice at least during larval dispersal [65–66] a recent study carried out on the panmictic American eel species showed the presence of genetically different ecotypes in fish [67]. Thus, the hypothesis of phenotypic plasticity should be interpreted carefully to explain the differences that we observed in a water impoundment context.

Nevertheless, there appear to be critical periods when the brain is most plastic and receptive to environmental influences [68]. Early life, with key transitions from one life stage to the next, such as early postnatal development and puberty with heightened neural development, is important for the development of sensory processes and cognition where the fishes have to adapt to a range of foraging opportunities, to cope with varying predation threats and social interactions [69]. Thus, it is not surprising to observe differences related to activity in neural circuitry at the glass eel stage (i.e. the post-larval stage). What is the most remarkable is the perseverance of those environmentally induced molecular phenotypes as well as its relationship with ecologically meaningful behaviour. The arising questions are how those changes affect the fish in their later stages, and whether they can be related to life history traits, life-lasting behavioural syndromes such as personality, sex determination or to their individual fitness.

Acknowledgments

This research was completed through the financial help of the HYNES joint team project (EDF and Irstea). We are thankful to Christian Rigaud for his advices and help during the field sampling, to Pablo Pelissier for his help during the Common Garden experiment, and to Maud Pierre for her help in statistical analyses.

References

- [1] M.C. Freeman, C.M. Pringle, C.R. Jackson, Hydrologic connectivity and the contribution of stream headwaters to ecological integrity at regional scales, *J. Am. Water Resour. Assoc.* 43 (2007) 5–14.
- [2] C.M. Pringle, Hydrologic connectivity and the management of biological reserves: a global perspective, *Ecol. Appl.* 11 (2001) 981–998.
- [3] D.A. Milton, Living in two worlds: diadromous fishes, and factors affecting population connectivity between tropical rivers and coasts, *Ecological Connectivity Among Tropical Coastal Ecosystems* (2009) 325–355.

- [4] K. Morita, S.H. Morita, S. Yamamoto, Effects of habitat fragmentation by damming on salmonid fishes: lessons from white-spotted charr in Japan, *Ecol. Res.* 24 (2009) 711–722.
- [5] E. Feunteun, A. Acou, J. Guillouët, P. Laffaille, A. Legault, Spatial distribution of an eel population (*Anguilla anguilla* L.) in a small coastal catchment of northern Brittany (France). Consequences of hydraulic works, BFPF — Bulletin Français de la Pêche et de la Protection des Milieux Aquatiques 71 (1998) 129–139.
- [6] C.C. Caudill, W.R. Daigle, M.L. Keefer, C.T. Boggs, M.A. Jepson, B.J. Burke, et al., Slow dam passage in adult Columbia River salmonids associated with unsuccessful migration: delayed negative effects of passage obstacles or condition-dependent mortality? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64 (2007) 979–995.
- [7] D.W. Roscoe, S.G. Hinch, Effectiveness monitoring of fish passage facilities: historical trends, geographic patterns and future directions, *Fish. Fish.* 11 (2010) 12–33.
- [8] M.J. Noonan, J.W.A. Grant, C.D. Jackson, A quantitative assessment of fish passage efficiency, *Fish. Fish.* 13 (2012) 450–464.
- [9] S.P. Kemp, Bridging the gap between behaviour, performance and hydrodynamics: an ecohydraulics approach to fish passage research, *River Res. Appl.* 28 (2012) 403–406.
- [10] R.L. McLaughlin, E.R.B. Smyth, T. Castro-Santos, M.L. Jones, M.A. Koops, T.C. Pratt, et al., Unintended consequences and trade-offs of fish passage, *Fish. Fish.* 14 (2012) 580–604.
- [11] C.M. Bunt, T. Castro-Santos, A. Haro, Performance of fish passage structures at up-stream barriers to migration, *River Res. Appl.* 28 (2012) 457–478.
- [12] S.J. Cooke, S.G. Hinch, Improving the reliability of fishway attraction and passage efficiency estimates to inform fishway engineering, science, and practice, *Ecol. Eng.* 58 (2013) 123–132.
- [13] C. Katopodis, J.G. Williams, The development of fish passage research in a historical context, *Ecol. Eng.* 48 (2012) 8–18.
- [14] S. Peake, F.W.H. Beamish, R.S. McKinley, D.A. Scruton, C. Katopodis, Relating swimming performance of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, to fishway design, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54 (1997) 1361–1366.
- [15] T. Castro-Santos, Quantifying the combined effects of attempt rate and swimming capacity on passage through velocity barriers, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61 (2004) 1602–16015.
- [16] P.S. Kemp, T. Tsuzaki, M.L. Moser, Linking behaviour and performance: intermittent locomotion in a climbing fish, *J. Zool.* 277 (2009) 171–178.
- [17] E. Edeline, Adaptive phenotypic plasticity of eel diadromy, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 341 (2007) 229–232.
- [18] F. Daverat, K.E. Limburg, I. Thibault, J.C. Shiao, J.D. Dodson, F. Caron, et al., Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 308 (2006) 231–241.
- [19] S. Bonhommeau, E. Chassot, E. Rivot, Fluctuations in European eel (*Anguilla anguilla*) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso Sea, *Fish. Oceanogr.* 17 (2008) 32–44.
- [20] J. Schmidt, Breeding places and migrations of the eel, *Nature* 111 (1923) 51–54.
- [21] W. Dekker, Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fish. Manag. Ecol.* 10 (2003) 365–376.
- [22] E. Feunteun, Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain, *Ecol. Eng.* 18 (2002) 575–591.
- [23] H. Drouineau, C. Rigaud, A. Laharanne, R. Fabre, A. Alric, P. Baran, Assessing the efficiency of an elver ladder using a multi-state mark-recapture model, *River Res. Appl.* 31 (2015) 291–300.
- [24] A. Sih, A. Bell, J.C. Johnson, Behavioural syndromes: an ecological and evolutionary overview, *Trends Ecol. Evol.* 19 (2004) 372–378.
- [25] S.J. Shettleworth, *Cognition, Evolution, and Behaviour*, Oxford University Press, USA, 2010.
- [26] D.E. Cocherell, A. Kawabata, D.W. Kratville, S.A. Cocherell, R.C. Kaufman, E.K. Anderson, et al., Passage performance and physiological stress response of adult white sturgeon ascending a laboratory fishway, *J. Appl. Ichthyol.* 27 (2011) 327–334.
- [27] C. Garenc, F.G. Silversides, H. Guderley, Burst swimming and its enzymatic correlates in the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): full-sib heritabilities, *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 76 (1998) 680–688.
- [28] S. Bureau du Colombier, V. Bolliet, P. Lambert, A. Bardonnnet, Energy and migratory behaviour in glass eels (*Anguilla anguilla*), *Physiol. Behav.* 92 (2007) 684–690.
- [29] E. Edeline, S. Dufour, P. Elie, Proximate and Ultimate Control of Eel Continental Dispersal. Spawning Migration of the European Eel, Springer, Netherlands, 2009 433–461.
- [30] T. Podgorniak, M. Milan, J. Pujolar, G. Maes, L. Bargelloni, E. De Oliveira, et al., Differences in brain gene transcription profiles advocate for an important role of cognitive function in upstream migration and water obstacles crossing in European eel, *BMC Genomics* 16 (2015) 1–10.
- [31] N. Diotel, Y. Le Page, K. Mouriec, S.K. Tong, E. Pellegrini, C. Valliant, et al., Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions, *Front. Neuroendocrinol.* 31 (2010) 172–192.
- [32] Y. Le Page, N. Diotel, C. Valliant, E. Pellegrini, I. Anglade, Y. Mérot, et al., Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm, *Eur. J. Neurosci.* 32 (2010) 2105–2115.
- [33] M. Martinez, H. Guderley, J.D. Dutil, P.D. Winger, P. He, S.J. Walsh, Condition, prolonged swimming performance and muscle metabolic capacities of cod *Gadus morhua*, *J. Exp. Biol.* 206 (2003) 503–511.
- [34] A. Coppe, J.M. Pujolar, G.E. Maes, P.F. Larsen, M.M. Hansen, L. Bernatchez, et al., Se-quencing, de novo annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered european eel, *BMC Genomics* 11 (2010).
- [35] A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, J.A.M. Leunissen, Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W71–W74.
- [36] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [37] C.J.L. Liu, N. Chaturvedi, C.J. Barnstable, E.B. Dreyer, Retinal Thy-1 expression during development, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37 (1996) 1469–1473.
- [38] T. Sherrin, T. Blank, C. Todorovic, c-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity, *Rev. Neuroscience* 22 (2011) 403–410.
- [39] M. Papa, M.P. Pellicano, H. Welzl, A.G. Sadile, Distributed changes in c-Fos and c-Jun immunoreactivity in the rat brain associated with arousal and habituation to novelty, *Brain Res. Bull.* 32 (1993) 509–515.
- [40] T. Miyashita, S. Kubik, G. Lewandowski, J.F. Guzowski, Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation, *Neurobiol. Learn. Mem.* 89 (2008) 269–284.
- [41] A. Lanahan, P. Worley, Immediate-early genes and synaptic function, *Neurobiol. Learn. Mem.* 70 (1998) 37–43.
- [42] C.G. Pontrello, M.Y. Sun, A. Lin, T.A. Fiacco, K.A. Defea, I.M. Ethell, Cofilin under control of beta-arrestin-2 in NMDA-dependent dendritic spine plasticity, long-term depression (LTD), and learning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E442–E451.
- [43] B. Racz, R.J. Weinberg, Spatial organization of cofilin in dendritic spines, *Neuroscience* 138 (2006) 447–456.
- [44] M. Bosch, Y. Hayashi, Structural plasticity of dendritic spines, *Curr. Opin. Neurobiol.* 22 (2012) 383–388.
- [45] D.M. Bannerman, R. Sprengel, Multiple memory mechanisms the long and the short of it, *EMBO J.* 29 (2010) 1790–1791.
- [46] A.M. Churcher, J.M. Pujolar, M. Milan, P.C. Hubbard, R.S.T. Martins, J.L. Saraiva, et al., Changes in the gene expression profiles of the brains of male European eels (*Anguilla anguilla*) during sexual maturation, *BMC Genomics* 15 (2014).
- [47] P.T. Niemelä, A. Vainikka, J.T. Forsman, O.J. Loukola, R. Kortet, How does variation in the environment and individual cognition explain the existence of consistent behavioural differences? *Ecol. Evol.* 3 (2013) 457–464.
- [48] E. Edeline, A. Bardonnnet, V. Bolliet, S. Dufour, P. Elie, Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behaviour, *Horm. Behav.* 48 (2005) 53–63.
- [49] E. Edeline, S. Dufour, C. Briand, D. Fatin, P. Elie, Thyroid status is related to migratory behaviour in *Anguilla anguilla* glass eels, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 282 (2004) 261–270.
- [50] H. Imbert, R. Arrowsmith, S. Dufour, P. Elie, Relationships between locomotor behaviour, morphometric characters and thyroid hormone levels give evidence of stage-dependent mechanisms in European eel upstream migration, *Horm. Behav.* 53 (2008) 69–81.
- [51] M. Castonguay, J.-D. Dutil, C. Audet, R. Miller, Locomotor activity and concentration of thyroid hormones in migratory and sedentary juvenile American eels, *Trans. Am. Fish. Soc.* 119 (1990) 946–956.
- [52] L. Préau, J.B. Fini, G. Morvan-Dubois, B. Demeneix, Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption, *Biochimica et Biophysica Acta — Gene Regulatory Mechanisms* 2015 (1849) 112–121.
- [53] J.G. Eales, The influence of nutritional state on thyroid function in various vertebrates, *Integr. Comp. Biol.* 28 (1988) 351–362.
- [54] L.M. Garcia-Segura, Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore, *J. Neuroendocrinol.* 20 (2008) 705–712.
- [55] G.D. Clemenson, W. Deng, F.H. Gage, Environmental enrichment and neurogenesis: from mice to humans, *Current Opinion in Behavioural Sciences* 4 (2015) 56–62.
- [56] M. Opendak, E. Gould, Adult neurogenesis: a substrate for experience-dependent change, *Trends Cogn. Sci.* 19 (2015) 151–161.
- [57] A.G.V. Salvanes, O. Moberg, L.O.E. Ebbesson, T.O. Nilsen, K.H. Jensen, V.A. Braithwaite, Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280 (2013) 13.
- [58] C. Sorensen, I.B. Johansen, O. Overli, Neural plasticity and stress coping in teleost fishes, *Gen. Comp. Endocrinol.* 181 (2013) 25–34.
- [59] J.F. Guzowski, B. Setlow, E.K. Wagner, J.L. McGaugh, Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268, *J. Neurosci.* 21 (2001) 5089–5098.
- [60] N.C. Berchtold, P.D. Coleman, D.H. Cribbs, J. Rogers, D.L. Gillen, C.W. Cotman, Synaptic genes are extensively downregulated across multiple brain regions in normal human aging and Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 34 (2013) 1653–1661.
- [61] H. Van Praag, B.R. Christie, T.J. Sejnowski, F.H. Gage, Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 13427–13431.
- [62] M.W. Voss, C. Vivar, A.F. Kramer, H. van Praag, Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity, *Trends Cogn. Sci.* 17

- (2013) 525–544.
- [63] H. Van Praag, G. Kempermann, F.H. Gage, Neural consequences of environmental enrichment, *Nat. Rev. Neurosci.* 1 (2000) 191–198.
 - [64] H. Tomoda, K. Uematsu, Morphogenesis of the brain in larval and juvenile Japanese eels, *Anguilla japonica*, *Brain Behav. Evol.* 47 (1996) 33–41.
 - [65] S. Pacariz, H. Westerberg, G. Björk, Climate change and passive transport of European eel larvae, *Ecol. Freshw. Fish* 23 (2014) 86–94.
 - [66] C.L. Côté, M. Castonguay, M.S. Kalujnaia, G. Cramb, L. Bernatchez, In absence of local adaptation, plasticity and spatially varying selection rule: a view from genomic reaction norms in a panmictic species (*Anguilla rostrata*), *BMC Genomics* 15 (2014).
 - [67] S.A. Pavey, J. Gaudin, E. Normandeau, M. Dionne, M. Castonguay, C. Audet, et al., RAD sequencing highlights polygenic discrimination of habitat ecotypes in the panmictic American eel, *Curr. Biol.* 25 (2015) 1666–1671.
 - [68] E. Knudsen, Sensitive periods in the development of the brain and behaviour, *J. Cogn. Neurosci.* 16 (2004) 1412–1425.
 - [69] L.O.E. Ebbesson, V.A. Braithwaite, Environmental effects on fish neural plasticity and cognition, *J. Fish Biol.* 81 (2012) 2151–2174.

3. Conclusion Article 2

Les civelles/anguillettes maintenues pendant deux mois sous des conditions strictement identiques montrent des différences dans le niveau de transcription de gènes liés, entre autres, à la plasticité synaptique et la neurogenèse. Ces différences sont similaires à celles observées chez les individus échantillonnés sur le terrain l'année précédente et analysés directement après échantillonnage (cf étude préliminaire, Chapitre 3). Les individus en amont de l'axe aquatique- ayant franchi un ou plusieurs obstacles aquatiques- présentent une surexpression des gènes d'intérêt par rapport aux individus capturés en aval de l'obstacle. Les profils d'expression génétique persistent après deux mois de stabulation et concernent les gènes impliqués dans la plasticité synaptique, la neurogenèse et l'activité thyroïdienne.

Ces profils transcriptomiques différents auraient une base génétique ou épigénétique. S'il s'agit d'une base génétique, alors les individus présents au pied du barrage devraient présenter un pool génétique hétérogène, à partir duquel certains individus seraient sélectionnés lors du passage par le barrage. Pour vérifier cette hypothèse, une analyse de la transcription des gènes simultanément avec une analyse du polymorphisme génétique (*via* le séquençage et l'analyse de SNP, Single Nucleotide Polymorphism) serait adéquate (Laporte *et al.* 2015; Pavey *et al.* 2015). Il est également possible que les différences d'expression des gènes se maintiennent tout au long de la vie de l'individu sans qu'elles soient liées à des différences génétiques. En effet, l'expression génétique peut être régulée temporairement ou de manière stable, voire transmise de façon héréditaire par des modifications chimiques de l'ADN qui vont moduler le niveau de transcription des gènes (sur ou sous expression et même une complète inhibition dans certains cas). On parle alors de modifications épigénétiques qui n'affectent pas directement la séquence nucléotidique des gènes mais qui agissent sur la molécule d'ADN par la fixation de groupements chimiques sur les bases azotées de l'ADN ou sur les histones (protéines autour desquelles l'ADN est enroulée) (Jiang *et al.* 2013).

Les résultats de l'étude pilote et du test de common garden indiquent que le cerveau joue un rôle essentiel lors du franchissement des obstacles. Or ce tissu est responsable en quasi-totalité du comportement de l'animal. De plus, la fonction des gènes soumis à la régulation différentielle concerne entre autres la cognition, qui englobe non seulement les capacités de perception et d'analyse de l'environnement, mais aussi le processus de prise de décision quant au comportement à adopter. Nos résultats suggèrent fortement qu'il peut y avoir des différences dans certains traits comportementaux entre les groupes d'individus

étudiés. Le comportement d'escalade mérite une attention particulière, car il doit être obligatoirement exprimé chez les individus en amont, i.e. ayant franchi l'obstacle.

Pour franchir l'obstacle, l'individu devrait d'abord exprimer la volonté d'escalader les parois (composante volitionnelle du comportement). Face à l'obstacle, les civelles essayent-elles toutes d'escalader les parois ? Le comportement d'escalade des individus est-il acquis ou inné ? Le contexte social (apprentissage social) joue-t-il un rôle lors de l'escalade des obstacles ? Les individus ayant traversé des obstacles sont-ils plus enclins à exprimer ce comportement que les individus 'naïfs' aux obstacles ? Enfin, existe-t-il une relation entre la tendance des individus à escalader des obstacles et l'expression des gènes impliqués dans la cognition ?

CHAPITRE 5 :

Comportement d'escalade et expression génétique :

Passe Expérimentale

1. Introduction Article 3

Le comportement animal est une réponse continue de l'individu aux conditions environnementales, et peut refléter aussi bien le statut physiologique de l'individu à un moment donné que son expérience acquise dans le passé (Snell-Rood 2013). Certains traits comportementaux peuvent être modifiés immédiatement et de manière labile (la flexibilité phénotypique ou plasticité comportementale 'activationnelle' (Snell-Rood 2013)) en réponse à des défis temporaires, tandis que d'autres sont plus stables et seraient d'avantage liés à la plasticité développementale. Ainsi, le comportement est présent dans les processus temporaires tels l'acclimatation et les réponses d'évitement des prédateurs (Hale *et al.* 2002; Snell-Rood 2013; Ward & Azizi 2004), mais il est aussi directement impliqué dans le « coping style » (concept défini plus bas dans ce chapitre) ou la personnalité de l'animal (Sih 2011; Stamps & Groothuis 2010). La réponse comportementale est, tout comme n'importe quel trait plastique du phénotype, dictée par l'éventail des normes de réaction possibles chez l'individu. On peut s'attendre alors à ce que, dans les mêmes conditions, certains individus soient capables d'exprimer un trait de manière plus marquée que d'autres. Dans cette perspective, nous avons soumis des jeunes stades d'anguille européenne à des tests de comportement d'escalade, un trait d'importance écologique cruciale dans notre étude.

Les individus provenant des différents segments de l'axe du Canal des Etangs ont été placés dans un dispositif de Passe Expérimentale, permettant d'observer et d'enregistrer automatiquement chaque événement d'escalade de l'individu. Nous avons mesuré pour chaque individu le nombre total d'escalades et le nombre d'escalades *per* test. On estime que cette tendance à escalader influe sur la probabilité de succès de franchir un obstacle. De plus, les individus étaient classés en fonction de l'ordre dans lequel ils escaladaient la passe pour la

première fois au début de chacun des quatre tests². Ce classement a permis d'attribuer à chaque individu un comportement de 'leader'/'follower'/'finisher'/'no climber' en fonction de l'ordre moyen de leur escalade durant toute l'expérience. L'attribution de ces comportements donne une idée de la capacité et de la rapidité avec laquelle un individu va explorer un nouvel environnement. Par exemple, les premiers individus escaladant la passe au début de chaque test ne suivent pas de stimuli sociaux (présence de conspécifiques, de molécules d'alarme etc.). L'exploration se fait donc en présence d'une information environnementale moins riche que dans le cas des individus labélisés comme 'followers' ou 'finishers'. Les individus 'leaders' pourraient posséder également une personnalité 'téméraire' ou un comportement proactif dans la nature (Harcourt *et al.* 2009a; Harcourt *et al.* 2009b; Jolles *et al.* 2015; McCowan & Griffith 2015). Ce dernier est associé au concept de '*proactive/reactive coping style*', c'est-à-dire la manière dont l'individu réagit face au stress environnemental (présence du prédateur, nouvel habitat etc). Ce concept est particulièrement intéressant dans notre contexte, car il existe également des liens entre la plasticité neuronale et le coping style. En effet, les individus proactifs sont généralement moins flexibles dans leur comportement que les individus réactifs, et expriment moins de stress lors des situations à risque. Leur comportement de routine ne requiert pas une analyse très détaillée de l'environnement, ce qui pourrait expliquer que leurs capacités cognitives (apprentissage, mémoire spatiale, processus de prise de décisions) soient moins développées que chez les individus réactifs (Niemelä *et al.* 2013; Øverli *et al.* 2007; Sorensen *et al.* 2013).

Cette hypothèse est particulièrement intéressante dans le contexte de notre étude, où les individus rencontrés en amont des obstacles présentent des différences dans le niveau de transcription des gènes liés à la plasticité neuronale. Dans cette étude comportementale, le niveau de transcription des gènes impliqués (*jun*, *egr-1*, *bdnf*, *camk2g*) a été qualifié par RT-qPCR à la fin de l'expérience, et comparé non seulement vis-à-vis des sites d'échantillonnage (origine des poissons), mais aussi vis-à-vis du comportement individuel des civelles/anguillettes pendant le test de la Passe Expérimentale.

2. Article 3

² NOTA : dans l'article, le mot « test »= « trial » et « expérience »= « test »



Cite this article: Podgorniak T, Blanchet S, De Oliveira E, Daverat F, Pierron F. 2016 To boldly climb: behavioural and cognitive differences in migrating European glass eels. *R. Soc. open sci.* **3**: 150665. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150665>

Received: 4 December 2015

Accepted: 22 December 2015

Subject Category:

Biology (whole organism)

Subject Areas:

cognition/molecular biology/behaviour

Keywords:

eel, dams, behaviour, brain, cognition

Author for correspondence:

T. Podgorniak

e-mail: tomasz_podgorniak@hotmail.fr

To boldly climb: behavioural and cognitive differences in migrating European glass eels

T. Podgorniak¹, S. Blanchet^{2,3}, E. De Oliveira⁴,
F. Daverat¹ and F. Pierron^{5,6}

¹Irstea Bordeaux, UR EABX, HYNES (Irstea—EDF R&D), 50 Avenue de Verdun, Cestas 33612 Cedex, France

²Station d'Écologie Expérimentale du CNRS à Moulis, USR 2936, 09200 Moulis, France

³CNRS, UPS, ENFA, Évolution et Diversité Biologique (EDB) UMR 5174, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, Cedex 9, France

⁴EDF R&D LNHE, HYNES (Irstea—EDF R&D), 6, quai Watier, Bat Q, Chatou 78400, France

⁵University Bordeaux, EPOC, UMR 5805, 33400 Talence, France

⁶CNRS, EPOC, UMR 5805, 33400 Talence, France

European eel (*Anguilla anguilla*) is a catadromous fish species that received substantial attention as its population has markedly declined in the last three decades. The possible causes of this decline include habitat fragmentation factors such as dams and weirs. In some cases, these obstacles are equipped with fish friendly passage devices that may select young eels according to their climbing behaviour. We tested how individual climbing tendency was related to the event of fishway passage experienced in the field and classified fish climbing profiles as climbing 'leaders', 'followers', 'finishers' and 'no climbers'. Moreover, we analysed the brain transcription level of genes related to neurogenesis and synaptic plasticity and compared it to climbing profiles. We found that fish from the upstream segments of an impounded river had a higher climbing propensity. Their behaviour was also more repeatable throughout the whole test than the obstacle-naïve fish from the downstream segment. Moreover, we found that boldly climbing 'leaders' had lower levels of transcription of synapse-related genes than the climbing 'followers'. These differences could be related to coping styles of fish, where proactive 'leaders' express a routine and risky behaviour, whereas reactive fish need an environmental assessment before exploratory behaviour. Our study showed that differences in climbing propensity exist in glass eels separated by water obstacles. Moreover, eels could adopt climbing different strategies according to the way they deal with environmental stress and to the cognitive abilities they possess.

1. Introduction

European eel (*Anguilla anguilla*) is a catadromous species with a high phenotypic plasticity [1,2], occupying a wide range of European inland and estuarine ecosystems. This species has a complex life cycle requiring two trans-Atlantic migrations. Firstly, leptocephali larvae migrate from the Sargasso Sea, their unique spawning ground, towards the European continental shelf [3]. Once arrived, they metamorphose into glass eels (i.e. post-larval stage) and many of them continue their migration to reach the upstream zones of inland waters, where they settle down for their juvenile growth phase. This stage can last from a few years to more than 20 years and ends with a second metamorphosis called silvering which prepares the future genitors (silver eels) for their transoceanic reproductive migration.

Owing to its strong population decline, the European eel is nowadays considered as 'critically endangered' [4], mainly because of overfishing, pollution, diseases and habitat fragmentation [5]. Habitat fragmentation is of growing concern today, as human-made water obstacles such as dams and weirs, built for river regulation and energy production are present on 80% of main European rivers [6]. Although eel possess a natural ability for climbing waterfalls, they are generally unable to perform such ascent on an artificial, dry concrete substrate, sometimes reaching up to 30 m in height. Increasing consciousness of the negative impact of such artificial obstacles on migratory fishes has led to the construction of fish friendly devices such as fishways and fish ladders. Fish passage devices are meant to facilitate fish migratory routes and their design improvements are subject of many ongoing studies [7,8]. However, while the efficiency of fish friendly devices is often assessed quantitatively [9], little is known about their impact on fish individual features and selectivity [10]. Indeed, in order to reach the upper tributaries, migrating eels need first to find the entrance of the pass and voluntarily express a willingness to climb, i.e. engage into the fishway and go out of the water. Secondly, they need to find the way through the fishway and be able to reach its upper zone, especially in case of long, steep and potentially energy demanding fish ladders. Thirdly, the event of climbing fish friendly devices, often performed under unusual environmental conditions, require from fish a different environmental perception, which could lead to changes in individual phenotypic traits, such as those related to neural activity [11]. In case of demographically self-sustaining populations, this selective impact of fish passes would reinforce or generate phenotypic differentiation within populations [12]. In the case of catadromous and panmictic eel species, fragmentation by weirs and dams could for instance generate phenotypically different eel population subsets below and above the obstacle.

Our study aimed at testing experimentally whether juvenile eels found in the upstream parts of an impounded river express a different climbing behaviour than those found in downstream areas. We hypothesized that the tendency to climb should be higher in fish from upstream areas because: (i) the behavioural selection has already operated on them: the upstream group of fish would contain only fish with innate climbing tendency, and because (ii) fish that have already experienced and succeeded in climbing across fish passes in the field would more likely climb an experimental fish pass device than the 'untrained' downstream fish. To test this hypothesis, we sampled juvenile eels from four different zones along an impounded river gradient and tested their climbing behaviour under standardized experimental conditions, i.e. on an experimental fish ladder. Moreover, as differences in the transcription level of genes related to cognitive function had already been detected among similar groups of fishes [11], and their long-term persistence was recently shown [10], we additionally measured the transcription level of four genes related to long lasting regulation of cognitive function [13,14] and compared it to experimentally measured climbing behaviour. Indeed, studies combining individual data on the current state of the fish (i.e. physiological analyses, behavioural tests, molecular profiles) have been recently proposed as a novel tool in research aimed at assessing the influences of hydropower barriers on fish populations [7]. We believe that combining these different approaches would help to better address the ecological and evolutionary consequences of habitat fragmentation on fish populations, notably by providing integrative responses of organisms to such stresses.

2. Material and methods

2.1. Sampling

Eels were collected using electric fishing during the 16th and 17th of June 2014 under similar climatic and hydrological conditions in the Canal des Etangs, an artificial freshwater corridor in the southwestern part of France (44.75–44.95° N, 1.1–1.2° W). The aquatic corridor is linear and the water flow is homogeneous

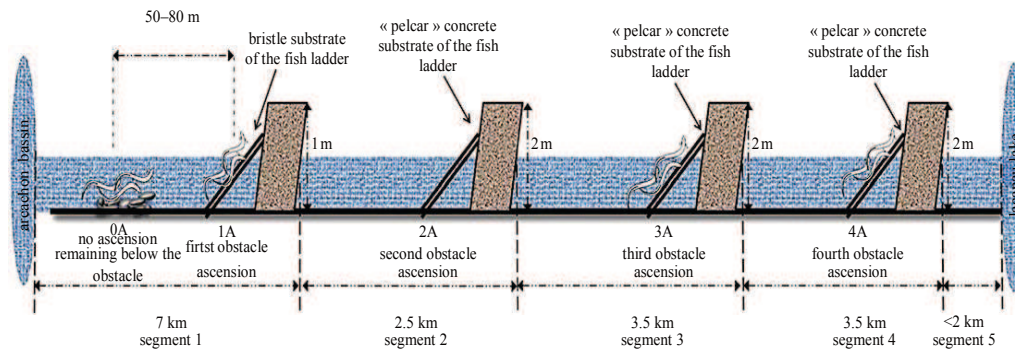


Figure 1. Sampling site characteristics. The height and type of the fishway in the first segment are different from the upstream segments. Fish from the group 0A and 1A are from the same segment, but caught when expressing different behaviour (remaining hidden in the substrate (0A) or ascending the fishway (1A)). Sampling size of the studied groups: 0A = 11, 1A = 9, 3A = 15, 4A = 14. Owing to the insufficient sampling size of the 2A group, fish from the second segment were not included in the study.

as it is controlled by a series of weirs (figure 1). Four successive low-distanced obstacles were built along the main channel, all equipped with a fish pass delimiting three successive river segments. The most downstream dam is equipped with a glass eel-specific pass, the three other are equipped with an eel pass (figure 1). A total of 49 individuals were sampled and used during the subsequent analyses. The number of animals per sampling site was distributed as follows (0A = 11, 1A = 9, 3A = 15, 4A = 14) according to their body size (between 75 and 85 mm) and health status (no externally visible pathogens). By sampling linear dammed sites, we ensure that certain fish have already expressed different climbing behaviour in the field (with expectedly no climbing event, and from one up to four climbing events, hereafter labelled, respectively, as 0A, 1A, 3A and 4A). In the two most downstream segments, individuals were sampled below the obstacle (0A), or caught while climbing the first fishway (1A). Fish from all the upstream segments (3A, 4A) were sampled directly on the fishway slope. Despite sampling efforts, the sampling size of the group of fish caught while climbing the second obstacle (2A group) was insufficient (six individuals of targeted body length), and was therefore not included in the study. All fish were brought alive to the laboratory for the behavioural test.

1.1. Behavioural test

After a prophylactic treatment (H_2O_2 , 250 ppm, 60 min), eels were individually marked by inserting with a sterile needle (0.23×4 mm) a 6 mm long RFID device (Nonatec, Lutronics) in the peritoneal cavity. Tagging, as well as body weight and length measurements were undertaken under fish anaesthesia (0.3 ml of eugenol, dissolved 1 : 10 in 95% ethanol and diluted in 10 l of water). After one week recovery in the same controlled conditions of light, food, temperature and water flow ($T = 22^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6$, 12 L : 12 cycle, fed with *Chironomidae* ad libitum), fish were placed into an experimental fishway (figure 2) and their climbing behaviour in group was observed during each of four consecutive experimental trials. Three behaviour variables were taken into account for each eel: the total number of ascensions, the mean number of ascensions *per* trial and the mean rank score of their first ascension. The mean rank score represents how fast each individual climbed for the first time the experimental device during each of the four trials. For each trial independently, the fish received 1 point of the rank score if its first ascension was among the fastest fish, i.e. if it climbed in front position within the first 33% of the climbing fish. All the fish whose first climb was situated within 33 and 66% of all the climbing fish received 2 points of the rank score and all the remaining climbers of the test received 3 points. If the fish did not climb during the trial, it received 4 points of the rank score. Thus, the fish that never climbed during all the four trials, received 16 points of the rank score, and their mean rank score was 4. On the other extreme, the individuals that always climbed in the first third part of the fish during all four trials received 4 points, with the mean rank score of 1. The mean rank score allows the assigning of each fish to one of four classes of 'peloton': 'leaders', 'followers', 'finishers' and 'no climbers'. A fish became a 'leader' if its mean rank score was less than 2, a 'follower' had the mean rank score within 2 and less than 3, and the 'finisher' within 3 and less than 4. The 'no climbers' class had a mean rank score of 4.

The experimental fishway was specifically built for behavioural analysis, i.e. the climbing behaviour test, which consisted of four separate 300 min trials. At the beginning of each trial, fish were placed in the starting box connected to a transparent tube inclined at 50° (figure 2). The transparent tube was equipped

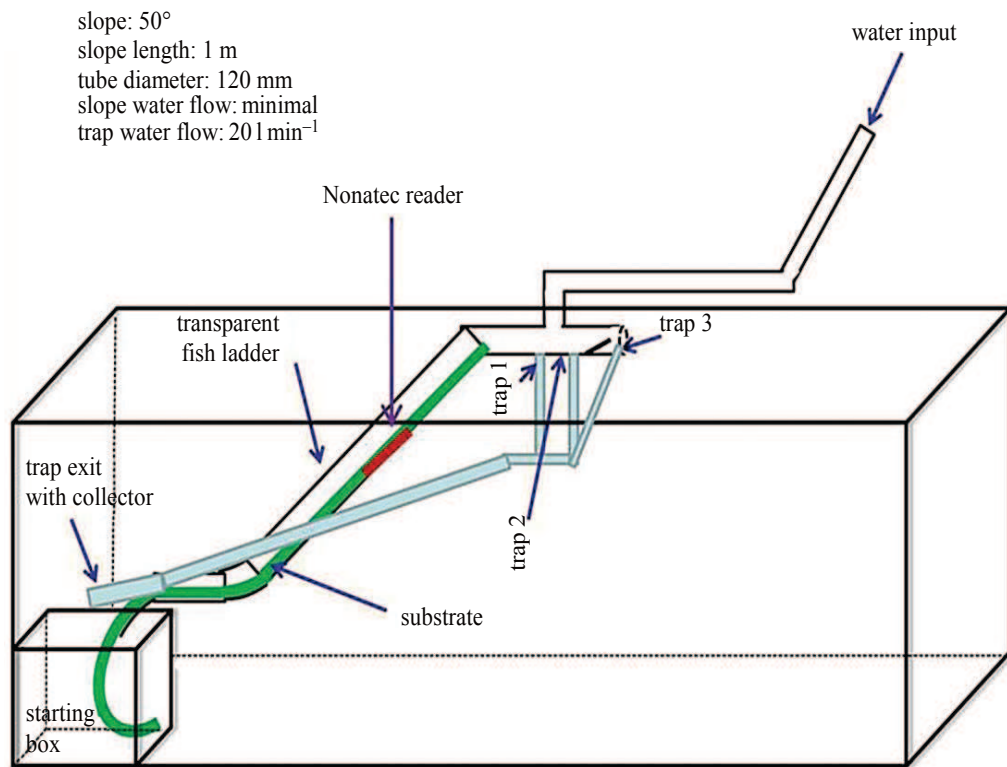


Figure 2. Schematic representation of the experimental fishway device.

with plastic grass-like substrate, similar to the substrate used for glass eel ladders. The upper part of the transparent tube was connected to a horizontal opaque tube with holes. The water was flowing through the tube (water flow on the slope was minimal) to induce fish climbing until the upper zone, where fish were caught into a fishnet-like collector. Turbulences in the upper zone of the tube were high, leading to the drop of fish into the trap directly connected to the starting box. During each trial, each climbing fish is automatically identified using NonatecTM Arm Reader (Lutronic) connected in the middle of the climbing slope, before it gets trapped and falls back into the starting box. At the end of each trail, the water flow was increased to ensure that the climbing fish fall down into the trap while preventing the others from climbing. The time lapse between each trial was 24 h. The whole experimental device was cleaned after each trial, to avoid interference with the odours from the previous test [15].

At the end of the experiment, body weight and length were measured, the monthly growth rates and body condition factors [16] were calculated, then fish were sacrificed by severing the medulla oblongata. The whole brain was extracted and stored in RNALater[®] buffer (Qiagen) for gene transcription analyses.

1.1. Gene transcription analysis

Four genes were chosen to specifically target a potentially long-term cognitive function in the brain (table 1). Four genes are associated with synaptic plasticity or its long-term effects on neural activity (long-term potentiation, LTP), i.e. activity-dependent strengthening of synapses [17,18], and some were also associated with social behaviour, coping styles, memory or learning [10,19–21].

For each gene, specific primer pairs were designed using the PRIMER3PLUS software [22] and were purchased from Sigma Aldrich. All primer pairs were reported in table 1. RNA extraction and qPCR analyses were performed as previously described [11]. Relative quantification of each gene transcription level was normalized according to the β -actin gene transcription. Hence, during our experiment, total RNAs were quantified and a same quantity was used for reverse-transcription. During the subsequent qPCR amplifications, the output cycle corresponding to β -actin was examined. This output was always obtained around the same output cycle and no significant variations were observed among conditions, demonstrating the relevance of the β -actin as the reference gene in our conditions.

Table 1. Primer pairs used for RT-qPCR analyses (*a* = Forward, *b* = Reverse). A total of four genes were chosen for brain analysis. β -actin was chosen as the reference gene.

short name	primer sequence	function	BLAST hit name	species	E-value
<i>camk2g</i>	GACGGAACTAAGGGGTCTCTCa AGGTCAACCCAGGATCACAGb	memory, synapse, LTP	XM_006630861.1 GI:573886134	<i>Lepistosteus oculatus</i>	0
<i>jun</i>	GATTCGACGTTACGGTTTTa TGTGGTTGACGCATTTTCATTb	memory, synapse, LTP	JN257262.1 GI: 357595814	<i>Carassius auratus</i>	0.0
<i>bdnf</i>	GGTCATCACTCTTCCACCTa AACCATGCAATTTCCACCATb	learning behaviour, IEG	XM_010793251.1 GI: 736296403	<i>Notothenia coniceps</i>	7.0×10^{-66}
<i>egr-1</i>	ACCTACTCCAGTGCCAGCTCa GAACAGGTAGTCGGGGATCAb	learning behaviour, IEG	JN230914.1 GI: 389566557	<i>Conger conger</i>	0
β -actin	CAGCCTTCCTCTCGGGTa AGTATTTGCGCTCGGGTGb	housekeeping gene	DQ286836.1 GI: 82798415	<i>Anguilla anguilla</i>	0

1.1. Data treatment and statistical analyses

Comparisons of body length, body weight and body condition factor among fish groups from different river sections (0A, 1A, 3A, 4A) or from different classes of peloton were performed after testing the assumptions of normality (Shapiro–Wilk test) and homoscedascity (Bartlett test) of the error terms. When these two assumptions were met, ANOVA analysis was used. When they were not met, a non-parametric Kruskal–Wallis test was applied. If significant effects were detected, a Tukey HSD or Wilcoxon tests (respectively) were used to determine whether means or medians significantly varied between pairs of samples.

Concerning the behavioural test, the total count of fish pass ascension was compared among groups using generalized linear models (GLMs) with a Poisson error-term distribution, whereas the frequency of ‘peloton’ classes was compared among groups using a χ^2 -test for frequency data (package MASS). The transcription level of the four genes was compared among the classes of ‘peloton’ (Kruskal–Wallis and Wilcoxon test, as the normality assumptions were not met). In addition, the repeatability of fish behavioural traits (number of ascensions *per* trial, rank score of first ascension *per* trial) was tested using intraclass correlation coefficient (ICC, package ICC) [23]. The ICC describes how strongly the units of the same group resemble each other and is based on the variance within versus among groups [23].

For all the statistical results, a probability of $p < 0.05$ was considered significant.

2. Results

2.1. Body length, weight and condition

No differences in fish initial (80 ± 7.6 mm; $\chi^2_3 = 1.18$, p -value = 0.76), and final body lengths (80.6 ± 7.4 mm; $\chi^2_3 = 1.13$, p -value = 0.77), or weights (initial: 517 ± 194 mg; $\chi^2_3 = 0.36$, p -value = 0.95; final: 554 ± 209 mg, $\chi^2_3 = 1.32$, p -value = 0.72) of fish were observed among groups.

2.2. Samplingsite of fish

Significant differences in climbing tendency were detected between 0A and 3A field groups (GLM, Poisson distribution, d.f. = 48, z -value = 2.82, p -value = 0.005) and between 0A and 4A field groups (GLM, Poisson distribution, d.f. = 48, z -value = 2.05, p -value = 0.04). Indeed, fish that climbed more than eight times in total during the whole test originated only from the most upstream groups, i.e. 3A and 4A (figure 3).

We found moderate to high significant levels of repeatability values for individuals from 3A and 4A groups and for the two behavioural traits, i.e. the number of ascension *per* trial as well as the rank score *per* trial (table 2). In other words, fish from the 3A and 4A groups kept a similar position in climbing groups and performed a similar number of ascensions throughout all the trials. Contrastingly, in the

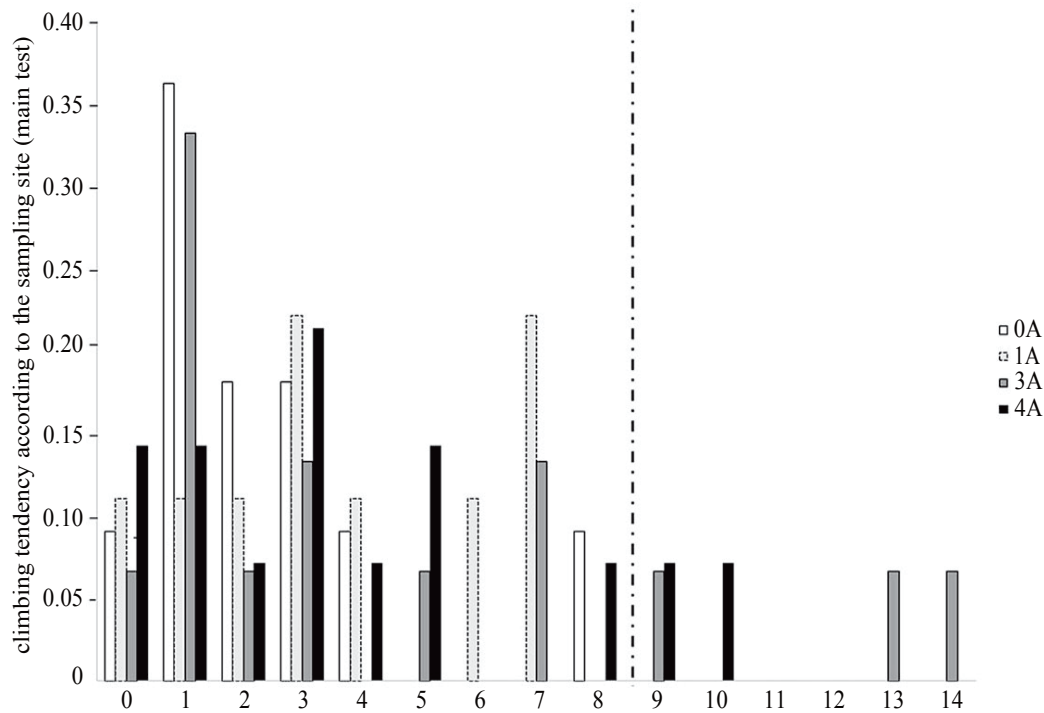


Figure 3. Proportion of fish from different sampling sites and expressing different climbing tendency (i.e. total number of ascensions). Sample sizes of the fish groups coming from different sampling sites: 0A = 11, 1A = 9, 3A = 15, 4A = 14.

Table 2. Repeatability of two behavioural variables, number of climbs *per trial* and rank score of the first climb *per trial* with respect to the sampling site of fish. (The 95% confidence intervals (CIs) are given for each value. The repeatability values in bold are statistically significant (lower CI > 0). Sampling size of groups: 0A = 11, 1A = 9, 3A = 15, 4A = 14.)

ICC						
origin	climb count per trial			rank score per trial		
	(lower CI)	value	(upper CI)	(lower CI)	value	(upper CI)
0A	(−0.054)	0.192	(0.575)	(−0.170)	0.008	(0.374)
1A	(−0.102)	0.149	(0.586)	(−0.116)	0.127	(0.564)
3A	(0.254)	0.508	(0.759)	(0.244)	0.499	(0.753)
4A	(0.153)	0.415	(0.707)	(0.023)	0.265	(0.590)

groups containing obstacle naive fish (0A and 1A to a lesser extent) repeatability values were low and not significant for any of the two traits (table 2, the 95% CI included 0 for the two traits).

1.1. Individual behaviour of fish

The group of fish labelled as ‘leaders’ (fish that climbed among the first third part of the fish during each trial) expressed the highest number of ascensions during the whole test. This group had also the highest (although not significant) repeatability value in climbing tendency. At the opposite end, the group of ‘finishers’ had the lowest repeatability value in climbing tendency and the lowest average number of ascensions during the whole test (table 3).

1.2. Distribution of individual behaviours according to the origin of fish

The overall proportions of fish of the different classes of variable peloton did not vary significantly among the sampling sites ($\chi^2_9 = 8.41$, p -value = 0.49). Interestingly, we observed that the 0A group was the only group that did not include any ‘leader’ fish (figure 4).

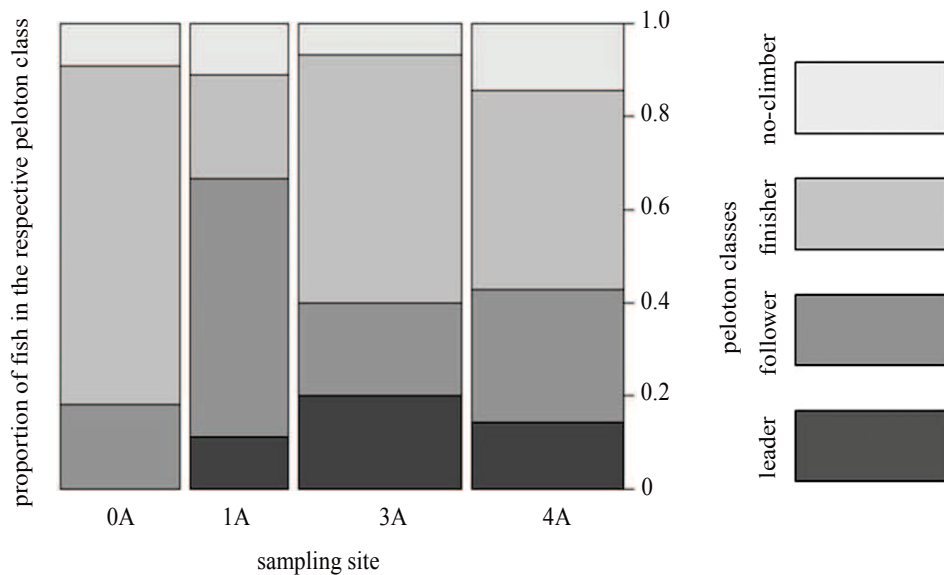


Figure 4. Proportion of fish of different 'peloton' classes (mean rank score during their first climb on the fishway) according to their sampling site. Four classes (leaders, followers, finishers, no climbers) and four sampling sites (0A, 1A, 3A, 4A) were compared. Size of peloton classes: leaders = 6, followers = 14, finishers = 24, no climbers = 5. Size of sampling site groups: 0A = 11, 1A = 9, 3A = 15, 4A = 14.

Table 3. Mean number of total climbs (i.e. climbing tendency), mean rank score, repeatability of climbing behaviour and number of individuals corresponding to the different classes of peloton. (Standard errors (s.d.) are provided for the first two variables, whereas the 95% CIs are given for the third one (repeatability).)

peloton variable	leader	follower	finisher	no climber
mean (s.d./CI)				
climb count <i>per trial</i>	8.5 (2.6)	6.1 (3.1)	1.8 (0.96)	0
rankscore	1.5 (0.27)	2.4 (0.26)	3.4 (0.29)	4 (0)
repeatability of first climb <i>per trial</i>	(-0.09) 0.21 (0.70)	(-0.10) 0.08 (0.40)	(-0.22) -0.15 (-0.01)	(0) 4 (0)
groupsize	6	14	24	5

3.5. Gene transcription levels

No differences were detected in gene transcription levels among sampling site groups.

Significant differences were observed between the peloton group of leaders and followers in the gene transcription level of *camk2g* ($W = 16$, p -value = 0.04), *jun* ($W = 14$, p -value = 0.03) and *bdnf* ($W = 17$, p -value = 0.05). Significant higher transcription levels were observed in followers in comparison to leaders (figure 5). Finishers presented intermediate values. Despite a similar pattern detected for the gene *egr-1* (increased level of transcription in followers compared with leaders), no significant difference was observed ($W = 19$, p -value = 0.08).

1. Discussion

This study focused on two behavioural variables of climbing. First, we accounted for the total number of ascensions, which could be interpreted as a result of climbing tendency and capacity. Second, we studied the order in which fish climbed for the first time during each trial, which could refer to behavioural traits such as the propensity to explore the new habitat, and that are often associated with bold personality types [24,25]. Moreover, the repeatability of this climbing order gave insight on how consistently the fish behave within the same sampling site group or within the group of similar mean ranking score.

Differences in climbing tendency were significant among sampling site groups, and the fish displaying extreme behaviour (more than eight climbing events) originated from the most upstream groups (3A

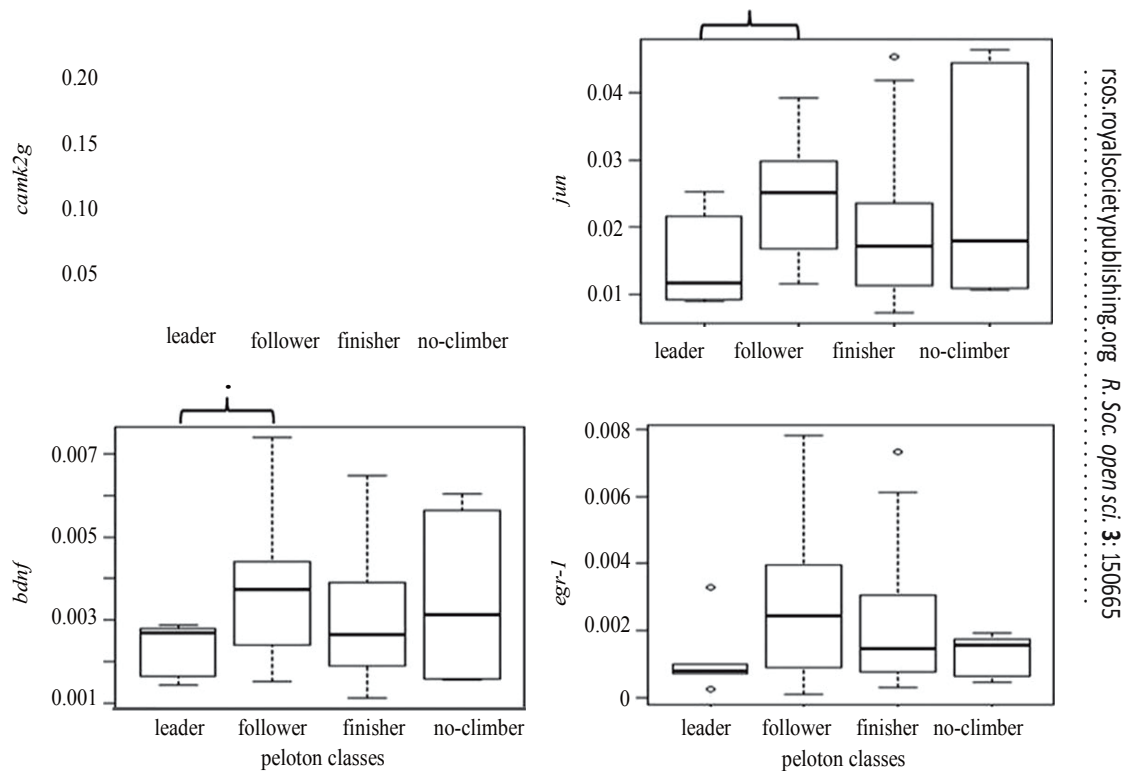


Figure 5. Mean gene transcription levels (arb. units) of fish with different climbing behaviour (i.e. peloton classes: leaders, followers, finishers and no climbers). Sampling size of groups: leader = 6, follower = 14, finisher = 24, no climber = 5. The significance level of the *p*-value is indicated with an asterisk ($0.01 < * < 0.05 < 0.1$).

and 4A). Moreover, we found that the repeatability in climbing tendency was significant and higher in the two upstream groups (3A and 4A), whereas it was not significant in the two most downstream sites (0A and 1A) harbouring fish with low or even no climbing experience. In addition, fish from the most upstream zones had the highest repeatability in climbing order, i.e. behaved in a more consistent way than the fish from the downstream zones. These behavioural extremes could be somehow associated with the events of obstacle ascension experienced in the field. Although it is still difficult to tease apart whether the association between fish distribution and climbing behaviour is due to selection or habituation, we undoubtedly demonstrate for the first time, to our knowledge, that fragmentation induced by humans lead to a strong downstream to upstream differentiation in climbing behaviour in eels. In order to deepen these results and get a new insight, we then investigated more precisely the rank of passage of individuals. The first fish climbing the pass device are of particular value. Indeed, these individuals needed to spatially explore the new, potentially hazardous zones and negotiate the passage without any social or chemical prior information. Their behaviour could involuntarily give insights on how risky the upstream zone is (by releasing alarm cues such as cortisol hormones into the water [26,27]) and lead the other fish of the group to follow, this being of particular importance in shaping the dynamics of the whole group. We thus classified the individuals according to their rank score, without taking into account their origin. We identified four classes called 'leaders', 'followers', 'finishers' and 'no climbers'. We found that the group of leaders not only expressed the highest number of ascensions during the whole test but also presented the highest repeatability in climbing tendency. We found that 'leaders' were absent in the obstacle-naïve group (0A). In other words, the group of the boldly climbing and motivated fish was found only in the upstream zones of the river axis. This is consistent with the fact that fish from the upstream zones (3A and 4A) had not only the highest climbing propensity but also a more consistent behaviour than fish from the obstacle-naïve group. Fish with low behavioural flexibility [28–30] and with lower aversion for risk-taking decisions are usually referred as proactive [31], in contrast to fish expressing a reactive coping style [19,32,33]. Reactive coping style is characterized by higher environmental appraisal, information processing and flexible behaviour highly dependent on stress and social cues, in opposition to proactive coping style, where individuals behave in a stereotypic, rather inflexible behaviour [28,30,34,35]. It has been shown that many species cope with socially or physically stressful situations with a simple dichotomy of heritable strategies, i.e. they adopt a proactive or reactive

response to the environment [31,36–38]. In our study, fish labelled as leaders could be associated with proactive coping style, as they perform a risky behaviour in climbing a new area without any social cues, guided only by their rheotactic behaviour. Fish labelled as followers would benefit from these cues and thus would be able to process the environmental information to assess the situation before engaging into the fishway. They have developed the ability for cognitive processes to a larger extent than the proactive leaders. In support of this hypothesis, the transcription level of several genes was significantly higher in the brain of followers in comparison to leaders. These genes are associated with neural activity, neurogenesis and brain plasticity. Such results are in agreement with the literature where typically routine dependent and inflexible behaviour in proactive individuals is associated with low transcription of neurogenesis-related genes [19]. Among differentially regulated genes, *camk2g* is a one of type 2 calcium/calmodulin-dependent protein kinases, Ca^{2+} -activated enzymes are associated with experience-dependent neural plasticity and behavioural memory as they control LTP [17,39], a molecular process of strengthening active synapses induced during learning and memory formation [40]. Similarly, C-JUN is a protein encoded by the *jun* gene and is a part of the activator protein (AP-1) early response transcription factor. *jun* is closely associated with synaptic plasticity and is involved in memory formation and learning [41,42]. Finally, the third gene *bdnf* encodes for a brain-derived neurotrophic factor involved in neurogenesis and synaptic plasticity, both related to learning and memory [43–45]. The gene *bdnf* together with *egr-1* (early growth response protein 1) are a part of the Immediate Early Genes (IEG) family. They represent a standing response mechanism that is rapidly activated at the transcription level in response to stimuli, before any new proteins are synthesized. Experimental study showed an overexpression of *bdnf* in rainbow trouts that learned to escape the dominant individuals [46]. In an experimental study on African cichlid, a high activity of *egr-1* was shown in the profile of ‘learners’ when compared with no learning fish [21]. In our study, *egr-1* did not show significant differences although the patterns detected between leaders and followers were similar to *bdnf* (higher transcription level in followers), thus reinforcing our hypothesis on differences in cognitive abilities between leaders and followers. In potentially challenging or stressful situations, a correct appraisal of the situation, learning and memory would allow the shaping of an adaptive behavioural response, where neurogenesis and synaptic modifications would play a role in underlying behavioural plasticity [19]. Here, cognitive processes can be particularly important in individuals trying to adjust their behaviour in response to environmental variations [47,48]. However, mechanisms implied in cognition may provide a substrate to enhanced behavioural flexibility, but higher influence of environment on behaviour can also involve a higher responsiveness to stressful conditions [30].

Our results can have an important ecological meaning when situated in the sampling context. As the sampling was performed at the end of the migration period, all the bold climbers, the ‘leaders’, have already climbed or were engaged at least into the first field obstacle fishway and thus were caught further upstream. In order to pass the first water obstacle, fish remaining downstream waited a new ‘migration window’, i.e. the arrival of new group of migrants perhaps containing some new boldly climbing individuals, behavioural variants hitherto called the climbing ‘leaders’. Indeed, an experimental study on zebrafish showed that the whole group can adopt a bolder behaviour in presence of new bold individuals [49]. The migration waves of glass eels through an impounded axis could be shaped by the arrival of the fish willing to explore fish passes without any social cues and possibility of risk-assessment of such behaviour.

Boldly climbing leaders could be followed by reactive individuals, which in turn would be followed by the main part of the resting fish. These last fish are not necessarily reactive as they could simply adopt the most common behaviour of the group (around two-thirds of the fish have climbed, with some individuals climbing several times per trial). This positive frequency dependence is a phenomenon known as social conformity or ‘copy the majority’ strategy [50], although empirical evidence in fish is still scarce [49].

In conclusion, our study suggests that different climbing behaviours exist in European glass eel. Those behaviours could be associated with cognitive performance, as well as coping styles (proactive–reactive responses) the fish adopt to deal with the environment. These results are of important ecological relevance. Boldly climbing fish are more likely found in the upstream zones of the impounded river axis. This implies that water obstacles act as selective filters on behavioural strategies of fish. If these behaviours have a (epi) genetic basis, considering that the escapement success of upstream silver eels is lower than downstream animals (e.g. due to increased mortality associated with fish growing in upstream river and turbines of hydropower stations [51,52]), we could suggest a switch in (epi) genetic polymorphism in the offspring, owing to, for example, reduced contribution of bold fish to the semelparous event of reproduction.

Finally, as the aquatic obstacles are implemented in the upstream migratory routes of glass eels to such a level that climbing is a part of migration phenomenon, we believe investigating how the dynamics of the whole group of climbers is shaped by the presence of the leaders could help explain why well-known abiotic factors (weather, temperature, water discharge) sometimes fail in predicting the migration waves of glass eels.

Ethics. All procedures used in this study were approved by the Aquitaine fish-birds Ethics Committee (a committee approved and registered by the French Ministry of Higher Education and Research under no. 73).

Data accessibility. The dataset supporting this article was uploaded as part of the electronic supplementary material.

Authors' contributions. All authors contributed equally to this study and gave final approval for publication.

Competing interests. We have no competing interests.

Funding. We received no funding for this study.

Acknowledgements. We are thankful to Christian Rigaud for his help in sampling, Pablo Pelissier for his help in experimental analysis, Maud Pierre and Felix Massiot-Granier for their help in statistical analysis. This study was realized as part of the HYNES Project (EDF R&D and Irstea). One of the authors (S.B.) works in a laboratory that is part of the Laboratoire d'Excellence TULIP (ANR-10-LABX-41).

References

- Daverat F *et al.* 2006 Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. *Mar. Ecol. Progress Ser.* **308**, 231–241. (doi:10.3354/meps308231)
- Edeline E. 2007 Adaptive phenotypic plasticity of eel diadromy. *Mar. Ecol. Progress Ser.* **341**, 229–232. (doi:10.3354/meps341229)
- Bonhommeau S, Chassot E, Rivot E. 2008 Fluctuations in European eel (*Anguilla anguilla*) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso Sea. *Fish. Oceanogr.* **17**, 32–44. (doi:10.1111/j.1365-2419.2007.00453.x)
- Dekker W. 2003 Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fish. Management Ecol.* **10**, 365–376. (doi:10.1111/j.1365-2400.2003.00352.x)
- Feunteun E. 2002 Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecol. Eng.* **18**, 575–591. (doi:10.1016/S0925-8574(02)00021-6)
- Vorosmarty CJ *et al.* 2010 Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* **467**, 555–561. (doi:10.1038/nature09440)
- Hasler CT, Pon LB, Roscoe DW, Mossop B, Patterson DA, Hinch SG, Cooke SJ. 2009 Expanding the 'toolbox' for studying the biological responses of individual fish to hydropower infrastructure and operating strategies. *Environ. Rev.* **17**, 179–197. (doi:10.1139/A09-008)
- Katopodis C, Williams JG. 2012 The development of fish passage research in a historical context. *Ecol. Eng.* **48**, 8–18. (doi:10.1016/j.ecoleng.2011.07.004)
- Noonan MJ, Grant JWA, Jackson CD. 2012 A quantitative assessment of fish passage efficiency. *Fish. Fish.* **13**, 450–464. (doi:10.1111/j.1467-2979.2011.00445.x)
- Podgorniak T, Angelini A, Blanchet S, de Oliveira E, Pierron F, Daverat F. 2015 Climbing experience in glass eels: a cognitive task or a matter of physical capacities? *Physiol. Behav.* **151**, 448–455. (doi:10.1016/j.physbeh.2015.08.001)
- Podgorniak T, Milan M, Pujolar J, Maes G, Bargelloni L, De Oliveira E, Pierron F, Daverat F. 2015 Differences in brain gene transcription profiles advocate for an important role of cognitive function in upstream migration and water obstacles crossing in European eel. *BMC Genomics* **16**, 1–10. (doi:10.1186/s12864-015-1589-y)
- Dias MS, Cornu JF, Oberdorff T, Lasso CA, Tedesco PA. 2013 Natural fragmentation in river networks as a driver of speciation for freshwater fishes. *Ecography* **36**, 683–689. (doi:10.1111/j.1600-0587.2012.07724.x)
- Gräff J, Mansuy IM. 2008 Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* **192**, 70–87. (doi:10.1016/j.bbr.2008.01.021)
- Day JJ, Sweatt JD. 2011 Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* **70**, 813–829. (doi:10.1016/j.neuron.2011.05.019)
- Briand C, Fatin D, Legault A. 2002 Role of eel odour on the efficiency of an eel, *Anguilla anguilla*, ladder and trap. *Environ. Biol. Fishes* **65**, 473–477. (doi:10.1023/a:1021172803705)
- Cren L. 1951 The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J. Anim. Ecol.* **20**, 201. (doi:10.2307/1540)
- Lisman J, Schulman H, Cline H. 2002 The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 175–190. (doi:10.1038/nrn753)
- Lisman JE, McIntyre CC. 2001 Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Curr. Biol.* **11**, R788–R791. (doi:10.1016/S0960-9822(01)00472-9)
- Sorensen C, Johansen IB, Overli O. 2013 Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **181**, 25–34. (doi:10.1016/j.ygcen.2012.12.003)
- Wolf C, Linden DEJ. 2012 Biological pathways to adaptability: interactions between genome, epigenome, nervous system and environment for adaptive behavior. *Genes Brain Behav.* **11**, 3–28. (doi:10.1111/j.1601-183X.2011.00752.x)
- Wood LS, Desjardins JK, Fernald RD. 2011 Effects of stress and motivation on performing a spatial task. *Neurobiol. Learn. Mem.* **95**, 277–285. (doi:10.1016/j.nlm.2010.12.002)
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. 2007 Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* **35**(Suppl. 2), W71–W74. (doi:10.1093/nar/gkm306)
- Wolak ME, Fairbairn DJ, Paulsen YR. 2012 Guidelines for estimating repeatability. *Methods Ecol. Evol.* **3**, 129–137. (doi:10.1111/j.2041-210X.2011.00125.x)
- Sih A, Bell A, Johnson JC. 2004 Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 372–378. (doi:10.1016/j.tree.2004.04.009)
- Réale D, Reader SM, Sol D, McDougall PT, Dingemanse NJ. 2007 Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biol. Rev.* **82**, 291–318. (doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00010.x)
- Kelley JL, Magurran AE. 2003 Learned predator recognition and antipredator responses in fishes. *Fish. Fish.* **4**, 216–226. (doi:10.1046/j.1467-2979.2003.00126.x)
- Brown GE. 2003 Learning about danger: chemical alarm cues and local risk assessment in prey fishes. *Fish. Fish.* **4**, 227–234. (doi:10.1046/j.1467-2979.2003.00132.x)
- Ruiz-Gomez MDL, Huntingford FA, Øverli Ø, Thörnqvist P-O, Höglund E. 2011 Response to environmental change in rainbow trout selected for divergent stress coping styles. *Physiol. Behav.* **102**, 317–322. (doi:10.1016/j.physbeh.2010.11.023)
- Ruiz-Gomez MDL *et al.* 2008 Behavioral plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with divergent coping styles: when doves become hawks. *Horm. Behav.* **54**, 534–538. (doi:10.1016/j.yhbeh.2008.05.005)
- Johansen IB, Sørensen C, Sandvik GK, Nilsson GE, Höglund E, Bakken M, Øverli O. 2012 Neural plasticity is affected by stress and heritable variation in stress coping style. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* **7**, 161–171. (doi:10.1016/j.cbd.2012.01.002)
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MAW, Blokhuis HJ. 1999 Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**, 925–935. (doi:10.1016/S0149-7634(99)00026-3)
- Coppens CM, De Boer SF, Koolhaas JM. 2010 Coping styles and behavioural flexibility: towards underlying mechanisms. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**, 4021–4028. (doi:10.1098/rstb.2010.0217)
- Sih A, Del Giudice M. 2012 Linking behavioural syndromes and cognition: a behavioural ecology perspective. *Phil. Trans. R. Soc. B* **367**, 2762–2772. (doi:10.1098/rstb.2012.0216)

34. Wolf M, Van Doorn GS, Weissing FJ. 2011 On the coevolution of social responsiveness and behavioural consistency. *Proc. R. Soc. B* **278**, 440–448. (doi:10.1098/rspb.2010.1051)
35. Vaz-Serrano J, Ruiz-Gomez ML, GjØden HM, Skov PV, Huntingford FA, Øverli Ø, Höglund E. 2011 Consistent boldness behaviour in early emerging fry of domesticated Atlantic salmon (*Salmo salar*): decoupling of behavioural and physiological traits of the proactive stress coping style. *Physiol. Behav.* **103**, 359–364. (doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.025)
36. Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM, Van Oortmerssen GA. 1991 Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia* **47**, 1008–1019. (doi:10.1007/BF01923336)
37. Benus RF, Den Daas S, Koolhaas JM, Van Oortmerssen GA. 1990 Routine formation and flexibility in social and non-social behaviour of aggressive and non-aggressive male mice. *Behaviour* **112**, 176–193. (doi:10.1163/156853990X00185)
38. Koolhaas JM, de Boer SF, Coppens CM, Buwalda B. 2010 Neuroendocrinology of coping styles: towards understanding the biology of individual variation. *Front. Neuroendocrinol.* **31**, 307–321. (doi:10.1016/j.yfrne.2010.04.001)
39. Lisman J. 1994 The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* **17**, 406–412. (doi:10.1016/0166-2236(94)90014-0)
40. Shors TJ, Matzel LD. 1997 Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behav. Brain Sci.* **20**, 597–655. (doi:10.1017/S0140525X97001593)
41. Papa M, Pellicano MP, Welzl H, Sadile AG. 1993 Distributed changes in c-Fos and c-Jun immunoreactivity in the rat brain associated with arousal and habituation to novelty. *Brain Res. Bull.* **32**, 509–515. (doi:10.1016/0361-9230(93)90299-Q)
42. Sherrin T, Black T, Todorovic C. 2011 C-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity. *Rev. Neurosci.* **22**, 403–410. (doi:10.1515/rns.2011.032)
43. Bramham CR, Messaoudi E. 2005 BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Progress Neurobiol.* **76**, 99–125. (doi:10.1016/j.pneurobio.2005.06.003)
44. Rossi C *et al.* 2006 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 1850–1856. (doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05059.x)
45. Panja D, Bramham CR. 2014 BDNF mechanisms in late LTP formation: a synthesis and breakdown. *Neuropharmacology* **76**, 664–676. (doi:10.1016/j.neuropharm.2013.06.024)
46. Carpenter RE, Sabirzhanov I, Arendt DH, Smith JP, Summers CH. 2008 Brain derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus (dorsolateral pallium) of rainbow trout is differentially regulated by coping strategy, revealed in a new model of fear conditioning. *Soc. Neurosci. Abs* **11**, 292.
47. Niemelä PT, Vainikka A, Forsman JT, Loukola OJ, Kortet R. 2013 How does variation in the environment and individual cognition explain the existence of consistent behavioral differences? *Ecol. Evol.* **3**, 457–464. (doi:10.1002/ece3.451)
48. Sol D, Duncan RP, Blackburn TM, Cassey P, Lefebvre L. 2005 Big brains, enhanced cognition, and response of birds to novel environments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 5460–5465. (doi:10.1073/pnas.0408145102)
49. Zala SM, Määttänen I, Penn DJ. 2012 Different social-learning strategies in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* **83**, 1519–1525. (doi:10.1016/j.anbehav.2012.03.029)
50. Efferson C, Lalive R, Richerson PJ, McElreath R, Lubell M. 2008 Conformists and mavericks: the empirics of frequency-dependent cultural transmission. *Evol. Hum. Behav.* **29**, 56–64. (doi:10.1016/j.evolhumbehav.2007.08.003)
51. Gomes P, Larinier M. 2008 Dommage subis par les anguilles lors de leur passage au travers des turbines Kaplan—Etablissement de formules prédictives, (p. 70, GHAAPE).
52. Marohn L, Prigge E, Hanel R. 2014 Escapement success of silver eels from a German river system is low compared to management-based estimates. *Freshwater Biol.* **59**, 64–72. (doi:10.1111/fwb.12246)

3. Conclusion Article 3

Le comportement d'escalade diffère fortement entre les individus. Le nombre d'escalade moyen par groupe diffère de manière significative entre les groupes amont/aval, et les individus exprimant les plus fortes tendances/motivation à escalader provenaient des sites amont. Ce résultat peut suggérer que l'expérience acquise lors du franchissement des obstacles dans la nature peut, par le processus de renforcement, faciliter ou inciter les individus à exprimer un comportement d'escalade pendant le test de la Passe Expérimentale. Aucune différence de niveaux de transcription de gènes n'a été détectée entre les groupes d'échantillonnage (pas de différences en fonction de l'origine), contrairement aux études précédentes. L'expression du comportement pendant le test aurait pu influencer le niveau de transcription génétique et ainsi masquer ces différences. En effet, nous avons observé des patterns de profils transcriptomiques relatifs à certains comportements que les individus exprimaient lors de l'escalade. Les leaders, i.e. individus qui sont souvent parmi les premiers à escalader la passe au cours de chaque test, présentaient des niveaux de transcription plus faible que le groupe d'individus qui les suivait, i.e. les followers. Ce résultat revêt un intérêt considérable s'il est placé dans le contexte du syndrome comportemental ou du coping style de l'animal. En effet, le concept de la personnalité animale permet de classer les individus en tant que audacieux ou timides (*shyness-boldness axis*), et se réfère à plusieurs traits comportementaux corrélés et des traits physiologiques sous-jacents exprimés chez les individus d'une manière stable dans le temps, quel que soit le contexte. Le concept similaire, le coping style, se réfère à la manière dont les individus font face à des situations particulières, souvent impliquant le stress (Coppens *et al.* 2010; Koolhaas *et al.* 1999) . On distingue des individus proactifs, peu affectés par les stress lors des situations « à risque » et performants dans la réalisation des tâches de routine, et les individus réactifs, affectés par le stress de manière plus importante dans un nouvel environnement, mais dotés des capacités cognitives plus importantes (perception des stimuli environnementaux, apprentissage spatial) et capables d'ajuster rapidement leur comportement aux conditions environnementales (flexibilité comportementale) (Johansen *et al.* 2012; Øverli *et al.* 2006; Ruiz-Gomez *et al.* 2011; Vaz-Serrano *et al.* 2011).

On pourrait assimiler les leaders aux individus téméraires ou proactifs, et les followers aux individus timides et réactifs. Les leaders sont capables d'explorer un nouvel environnement en situation de danger potentiel et sans avoir recours à une information sociale

émise par les conspécifiques. En effet, les individus qui montent la passe en premier possèdent une appréciation du nouvel environnement moins riche que les individus qui le suivront. Les followers ont accès à cette information laissée par les leaders (signaux d'alarme, hormones de stress), et pourraient l'utiliser avant de prendre une décision sur le comportement à adopter (escalader ou pas). Comme nous l'avons mentionné dans les chapitres précédents, la perception et l'analyse des informations environnementales sont des composantes des processus cognitifs. Dans cette perspective, nous pouvons expliquer la sollicitation de gènes impliqués dans la cognition animale chez le followers, mais aussi faire des liens entre le comportement de followers et le coping style réactif, puis le comportement des leaders et le coping style proactif des individus.

L'absence de leaders dans le groupe d'individus échantillonnés en aval du premier ouvrage pourrait avoir une signification écologique. En effet, le comportement proactif des leaders signifierait que les individus une fois arrivés au pied de l'obstacle tenteront de le franchir, même si cela nécessite d'exprimer un nouveau comportement (l'escalade, sortie en dehors de l'eau) et d'explorer une nouvelle zone. Ils pourraient effectuer l'escalade en absence de congénères sur la passe. Leur fenêtre de passage par l'obstacle est donc plus large que celle des individus réactifs (followers). Il se peut qu'à certains moments, on pourrait observer un groupe d'individus réactifs au pied du premier obstacle, en attente d'un individu proactif, initiateur du mouvement d'escalade, qui sera par la suite copié par les congénères.

CHAPITRE 6 :

Conclusion générale

La présente étude a mis en évidence 1) qu'il existe une variabilité interindividuelle dans le niveau de transcription des gènes exprimés dans le cerveau de civelles d'anguille européenne échantillonnées en aval et amont d'obstacles aquatiques (Article 1), 2) que ces différences persistent à moyen terme en conditions environnementales homogènes (Article 2), 3) et que ces modifications peuvent être associées au comportement que les individus expriment en groupe lors du franchissement d'une passe à civelle (Article 3). Chacun de ces résultats permet de contribuer à la connaissance générale de l'écologie de l'espèce, tels la structuration des traits phénotypiques de la population ou les effets jusqu'à maintenant ignorés induits par le passage des barrages, mais aussi attire l'attention sur l'importance de mener des études préliminaires à large spectre d'investigation et sans *a priori*.

En effet, pour aborder la problématique de l'effet des obstacles aquatiques sur les civelles/anguillettes migrantes, deux choix étaient possibles. Nous pouvions cibler les traits déjà étudiés dans le passé et reconnus comme ayant un impact potentiel dans la propension/aptitude des civelles à migrer, tels l'activité thyroïdienne (Edeline *et al.* 2004; Edeline *et al.* 2009), la condition corporelle/physique, la taille (Imbert *et al.* 2008), les réserves énergétiques (Bureau du Colombier *et al.* 2007; Bureau du Colombier *et al.* 2008) ou le comportement (Geffroy *et al.* 2015). La sélection *a priori* de ces traits d'intérêt aurait été en quelque sorte une solution de facilité car elle aurait permis de construire un design expérimental pour toute la durée de thèse et ce dès le début du projet. Elle aurait aussi permis d'analyser chaque trait aussi bien au niveau moléculaire (analyse de l'expression des gènes impliqués dans ces traits) qu'à un niveau d'intégration biologique supérieur, voire de l'organisme entier. Cependant les hypothèses testées auraient concerné un spectre restreint de voies métaboliques et de fonctions biologiques à l'échelle de l'organisme entier. Une alternative à cette méthodologie réside dans l'analyse en aveugle d'une large gamme de traits phénotypiques, sans *a priori*. Cette stratégie a permis, d'après nous, de non seulement vérifier les traits dont l'implication dans la migration avait été suggérée, mais aussi de découvrir de nouvelles composantes phénotypiques non suspectées jusqu'à présent. La durée du projet

étant relativement courte, il n'était pas possible d'étudier une large gamme de traits à un haut niveau d'intégration phénotypique supérieur ET à échelle individuelle (p.ex. concentration de l'hormone thyroïdienne et des réserves énergétiques, capacités natatoires, traits comportementaux). Ainsi, nous avons décidé d'adopter une analyse sans *a priori* avec une **approche descendante** (*top down approach*) (Shahzad & Loor 2012), c'est à dire partir d'une échelle de complexité haute (3 tissus, responsables d'une variété de fonctions biologiques vitales) et d'essayer de détecter des traits phénotypiques au niveau moléculaire, le niveau d'expression de gènes, qui demeure très en amont dans le niveau de l'organisation de complexité de l'organisme (Oltvai & Barabási 2002). La puce à ADN, qui permet de mesurer le niveau d'abondance d'ARNm codés par plusieurs milliers de gènes a été utilisé pour l'étude pilote. Cette étude a fourni deux résultats importants. Tout d'abord, l'absence de différences dans le tissu musculaire et le foie a permis d'écarter les hypothèses liées à la capacité de nage/endurance et aux réserves énergétiques. En effet, on s'attendait à ce que le foie par exemple, de par son rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique (siège de la lipolyse et de la lipogenèse), reflète l'état énergétique de l'individu (Plagnes-Juan *et al.* 2008; Tseng & Hwang 2008), et que les voies métaboliques utilisées par le muscle (aérobie, anaérobie) pour produire de l'ATP soient sollicitées de manière différente en fonction des capacités ou du type de nage (Garenc *et al.* 1998; Martinez *et al.* 2003). Toutes les différences détectées concernaient le tissu cérébral, ce qui constitue un résultat assez surprenant en soi. En effet, peu d'études portent sur le cerveau de l'anguille d'une manière générale, et à notre connaissance aucune analyse du cerveau n'a été faite dans le contexte migratoire des jeunes stades d'anguilles. Notre premier résultat montre que l'analyse sans *a priori* peut s'avérer un choix pertinent dans le cas d'études préliminaires. C'est particulièrement vrai quand on regarde la fonction de la plupart des gènes détectés. En effet, établir une hypothèse initiale évoquant des différences dans l'activité/plasticité neuronale dans le contexte de franchissement d'obstacles aquatiques était très peu probable, car elle n'aurait pas été appuyée ou aiguillée par la littérature scientifique disponible dans le domaine. De plus, comme la liste des gènes impliqués dans cette fonction est très large et le nombre des gènes choisis resterait restreint, tomber sur les séquences précises soumises à la régulation relèverait en partie du hasard.

La détection des différences dans le niveau de transcription des gènes liés à l'activité neuronale entre les individus échantillonnés en section amont et aval du canal a permis d'orienter nos recherches et les études suivantes. Tout d'abord, une recherche bibliographique

a été effectuée dans le domaine de la neurobiologie, nécessaire pour comprendre les cascades impliquées dans la fonction synaptique, les mécanismes de renforcement et de maintien de l'activité neuronale, et finalement identifier les gènes/protéines sollicités lors de ces processus. L'analyse de nouveaux gènes, sélectionnés avec un fort *a priori* pour leur spécificité vis-à-vis de la fonction recherchée, a permis de consolider l'hypothèse élaborée à partir des résultats préliminaires. L'étude suivante n'avait pas seulement pour objectif de valider notre hypothèse, elle a également donné un aperçu sur l'aspect temporel des différences observées, et ainsi sur la nature des mécanismes impliqués.

En effet, la stabulation à long terme sous des conditions strictement homogènes a permis d'éliminer toute composante environnementale susceptible d'induire une différence entre les groupes amont-aval et d'influencer l'expression du phénotype des individus. Après deux mois de maintien en common garden, les individus provenant des sites amont-aval du canal présentaient des différences dans le niveau de transcription des gènes impliqués dans les fonctions de neurogenèse, métabolisme de la thyroïde et plasticité neuronale. La technique d'analyse utilisée nécessitant le sacrifice de l'animal, il n'était pas possible de tester les niveaux de transcription des gènes avant et après l'expérience chez les mêmes individus. Cependant, ces résultats corroborent ceux obtenus lors de l'étude préliminaire. En effet, les groupes d'individus de l'expérience préliminaire provenaient des mêmes sites que ceux de l'expérience de common garden, mais furent sacrifiés immédiatement après l'échantillonnage sur le terrain. Comme à l'issue du common garden, une induction des gènes dont la plupart était impliqués dans la fonction de plasticité neuronale fut observée. L'expérience de common garden a montré la persistance des phénotypes moléculaires étudiés. Elle a également réfuté l'hypothèse avancée à la suite de l'étude pilote, suggérant que les différences observées entre les individus les plus amont et en aval de l'axe n'étaient pas la conséquence du passage des individus par l'obstacle, mais liées plutôt au comportement exprimé au moment précis de l'échantillonnage. En effet, les individus situés les plus en amont étaient tous échantillonnés pendant leur ascension de l'obstacle, alors que les individus provenant des parties aval du canal (avant le premier ou deuxième barrage) étaient échantillonnés dans les zones 'de repos' en présence de nombreuses cachettes et pas directement sur l'obstacle. Cependant, si l'induction des gènes était influencée uniquement par le comportement en temps réel, nous n'aurions pas observé de différences entre les groupes échantillonnés sur la passe et au pied de l'obstacle à la fin du common garden. Il s'agirait ici soit d'une augmentation des niveaux de transcription des gènes induite par le passage des obstacles et qui serait maintenue ensuite

pendant une longue période (i.e. l'expérience de passage acquise/comportement d'escalade appris), soit de différences dans la régulation de la transcription des gènes qui préexistaient chez les poissons avant qu'ils rencontrent l'obstacle. La fonction des gènes soumis à la régulation différentielle à long terme peut faire penser aux mécanismes d'apprentissage et d'acquisition de la mémoire. Les individus en aval du premier obstacle n'ont pas encore eu besoin de sortir en dehors de l'eau ou de grimper les surfaces verticales. Lors du passage de chaque obstacle, les individus ont acquis l'expérience d'escalade, la capacité à effectuer des mouvements de reptation en dehors de l'eau, à choisir la direction d'escalade correcte dans un nouveau milieu et ce, sans utiliser les stimuli habituellement disponibles dans l'eau. Cette capacité à escalader les obstacles pourrait être acquise lors du premier passage et consolidée par le processus de renforcement lors des passages suivants. On pourrait donc s'attendre à une augmentation de la tendance à escalader l'obstacle chez les individus échantillonnés le plus en amont. En effet, l'étude suivante a montré que les individus non naïfs aux obstacles (i.e. ayant déjà passé au moins un obstacle sur le terrain), en particulier ceux situés dans les deux sites les plus en amont du canal, expriment le comportement d'escalade de la passe expérimentale le plus marqué. Lors de ce test comportemental, les individus étaient aussi divisés en quatre classes en fonction de leur rang de passage lors la première ascension de la passe. Ainsi, les « leaders » escaladaient la plupart du temps en tête de peloton, les « followers » suivaient les leaders, et les « finishers » étaient les derniers à escalader la passe, laissant les « no-climbers » en bas du dispositif d'escalade. Les « leaders » expriment un comportement d'exploration d'une nouvelle zone dans un contexte particulier, car avec peu ou voire en absence totale de stimuli environnementaux (p.ex. olfaction, particulièrement développée chez les civelles, signaux d'alerte, hormones de stress) provenant d'autres individus ayant déjà escaladé, permettant d'estimer le niveau de risque lors de leur engagement sur la passe expérimentale. Ils expriment un comportement potentiellement à risque, en quelque sorte similaire au comportement des individus « téméraires » décrits dans les études de personnalité animale ou encore des individus « proactifs » définis selon la manière dont ils répondent aux situations de stress. En effet, les tests classiques utilisés pour évaluer la personnalité des animaux sont basés sur un dispositif constitué d'une zone d'acclimatation connectée à une zone « à risque » (espace dégagé, sans cachettes ou présence du prédateur), où le temps et l'ordre de sortie de la zone d'acclimatation, ainsi que le temps passé dans la zone 'à risque' servent à mesurer la tendance exploratoire et l'audace (*boldness*) des individus (Beckmann & Biro 2013; Naslund *et al.* 2015). Ici, la zone de départ des anguillettes pourrait être associée à la zone d'acclimatation (avec un espace abrité sous la passe), et la passe expérimentale elle-même

ferait office de zone à risque et ouverte. Notre étude a montré que tous les leaders provenaient des sites amont, i.e. ils ont déjà passé au moins un obstacle sur le terrain. Un individu peut devenir leader pour plusieurs raisons. Il peut avoir une motivation plus prononcée pour explorer un nouveau territoire, cette motivation étant le plus souvent liée à la faim dont l'individu souffre au moment précis du test (King *et al.* 2009). On écarte cette hypothèse, car tous les individus étaient nourris *ad libitum*. D'autres facteurs déclenchant le comportement de leader des animaux concernent le tempérament (personnalité) de l'individu, son statut hiérarchique (dominance) dans le groupe, mais aussi son expérience (King *et al.* 2009; Mueller *et al.* 2013; Reebs 2010). Les résultats de l'analyse transcriptomique réalisée au cours de l'étude précédente (common garden) ont suggéré que les fonctions d'apprentissage et d'acquisition de la mémoire sont sollicitées chez les individus ayant escaladé au moins un obstacle sur le terrain, ce qui pourrait être interprété ici comme une acquisition d'expérience, du savoir-faire des individus face à la passe à poissons. Cependant, le rôle de la personnalité des poissons ne peut pas être exclu ou sous-estimé. A la fin du test comportemental, aucune différence n'a été détectée dans les niveaux de transcription des gènes liés à la plasticité neuronale entre les groupes provenant des différents sites d'échantillonnage. Cependant, la comparaison des profils transcriptomiques entre les leaders et les followers a révélé des niveaux de transcription plus importants chez les followers. Ces résultats indiquent que le comportement exprimé lors du test de la passe expérimentale pourrait altérer les différences de transcription des gènes directement observés après échantillonnage (Podgorniak *et al.* 2015b) ou après deux mois de stabulation (Podgorniak *et al.* 2015a). Ils indiquent également qu'au niveau moléculaire, la fonction cognitive serait plus importante non pas chez les individus aptes au comportement de risque (les « téméraires » leaders), mais chez les individus qui les suivent. Ce résultat prend beaucoup de sens lorsqu'il est replacé dans le contexte de *stress coping style* des animaux. Suivant ce concept, deux stratégies sont adoptées par les individus lorsqu'ils font face à des situations nouvelles, stressantes et potentiellement à risque. Les individus proactifs expriment un comportement audacieux, ont tendance à moins stresser dans les situations exigeantes et à exprimer un comportement de routine, invariant ou peu influencé par les stimuli sociaux (Øverli *et al.* 2007). Les individus réactifs sont généralement moins performants dans la réalisation des tâches de routine, mais sont capables d'une flexibilité comportementale plus grande, intégrant les informations environnementales et les stimuli sociaux (Bolhuis *et al.* 2004; MacKenzie *et al.* 2009). Le délai de latence nécessaire à la réalisation d'une tâche de routine ou l'expression d'un comportement à risque chez les individus réactifs résulterait d'une influence plus forte de l'environnement sur leur

phénotype (p.ex. le niveau de cortisol plus fort en présence de danger potentiel), mais aussi du temps nécessaire pour que l'individu puisse analyser l'environnement et exprimer un comportement adapté (Bousquet *et al.* 2015). Plusieurs études ont suggéré que les individus réactifs possèdent une meilleure performance cognitive que les individus proactifs (Bousquet *et al.* 2015; Johansen *et al.* 2012; Wong *et al.* 2015), car elle serait nécessaire pour la perception et l'appréciation correcte de l'environnement (Niemelä *et al.* 2013). Dans notre cas, les anguillettes classées comme leaders seraient des individus proactifs, capables d'exprimer rapidement un comportement « à risque », sans que l'analyse de l'environnement soit nécessaire. Ils seraient aussi moins influencés par les facteurs sociaux (présence des congénères), une faible attraction sociale étant évoquée comme caractéristique aussi bien chez les proactifs (Øverli *et al.* 2007) à forte tendance exploratoire (McCowan & Griffith 2015) et les leaders (Jolles *et al.* 2015). Les individus réactifs seraient associés aux anguillettes classées comme followers. Ils mettraient plus de temps avant de s'engager dans la passe, et attendraient d'abord des signaux sociaux pour évaluer l'environnement. Leur performance d'escalade (le nombre total d'ascensions de la passe) serait plus faible, car ils disposeraient de moins de temps entre leur première ascension et la fin du test et/ou ils exprimeraient un intérêt moins prononcé à répéter le comportement d'escalader si l'issue de chaque ascension est la même, c'est-à-dire le retour à la case de départ. Les followers seraient plus sensibles aux stimuli environnementaux et possèderaient des capacités cognitives plus développées, nécessaires à la perception et l'appréciation correcte de l'environnement, puis la prise de décision sur le comportement à adopter en présence de la passe. Nos résultats renforcent cette hypothèse car ils montrent la sollicitation plus prononcée des gènes impliqués dans la plasticité neuronale chez les followers, suggérant un potentiel de cognition plus important dans ce groupe. Concernant les individus effectuant leur première ascension parmi les derniers du groupe, ils pourraient exprimer un comportement de conformité, c'est-à-dire copier la stratégie de la majorité du groupe (Efferson *et al.* 2008; Whitehead & Richerson 2009), mais ce phénomène reste encore assez peu étudié chez les poissons (Day *et al.* 2001; Pike & Laland 2010; Zala *et al.* 2012). De plus, les anguilles au stade civelle sont souvent observées en groupe, or le comportement de conformité et le comportement grégaire restent difficiles à séparer (van Leeuwen & Haun 2014).

Les résultats de notre étude montrent que les obstacles aquatiques peuvent impacter les civelles/anguillettes en migration. Nous avons mis en évidence des patterns de répartition des profils transcriptomiques différents chez des individus distribués le long d'un axe aquatique

fragmenté par des obstacles de taille moyenne. On ignore les mécanismes **proximaux** impliqués dans la régulation des gènes détectés par notre étude. Préciser l'origine de ces différences au niveau cellulaire/moléculaire permettrait d'interpréter la présence des obstacles comme facteur sélectif ou inducteur des profils transcriptomiques observés. Ces différences dans la fonction de plasticité neuronale restent stables dans le temps, suggérant que la base de ces traits serait génétique ou épigénétique. Si des mécanismes épigénétiques sont mis en jeu, la régulation des gènes détectés pourrait être, entre autres, induite lors du passage par les obstacles. Dans ce cas, on pourrait parler d'un enrichissement du pool épigénétique de la population d'anguilles. L'épigénétique est une discipline récente et la notion de polymorphisme épigénétique demeure encore peu étudiée et ne fait que commencer à faire sa place à côté du concept de diversité génétique (Avramidou *et al.* 2015; Grativol *et al.* 2012; Markov *et al.* 2014; Morange 2005; Neildez-Nguyen *et al.* 2008). Dans le cas des anguilles, une étude expérimentale a déjà suggéré l'implication des mécanismes épigénétiques dans les normes de réaction observés (Côté *et al.* 2014). D'une manière générale, les modifications épigénétiques permettrait une évolution plus rapide que les variations génétiques (mutations par exemple) (Bossdorf *et al.* 2008). Cependant, pour qu'il y ait des effets évolutifs à long terme de cet enrichissement du pool épigénétique, les marques épigénétiques doivent être héréditaires. Or, l'héritabilité des traits épigénétiques reste controversée et sujet à débat (Crews & Gore 2014), et la validation de cette hypothèse nécessiterait des analyses complémentaires. De ce fait, aucune interprétation ne sera fournie dans notre étude. Dans le cas où les profils transcriptomiques auraient une base génétique, la présence des obstacles aquatiques serait un filtre sélectif, ce qui pourrait aboutir à l'appauvrissement du pool génétique à long terme. En effet, si la **valeur sélective** des génotypes retrouvés en amont des obstacles est différente, alors la composition des traits génétiques à la génération suivante pourrait être modifiée. Dans un cadre hypothétique, les individus ayant effectué leur phase de croissance en amont auraient une **aptitude phénotypique** différente, en bénéficiant d'un succès reproducteur plus élevée ou en souffrant d'une survie plus faible que les individus en aval. A titre d'exemple, la proportion de femelles retrouvées en amont est plus forte qu'en aval (Oliveira & McCleave 2000; Tesch & Thorpe 2003). Bien que le déterminisme du sexe serait influencé aussi bien par une composante génétique qu'environnementale (Côté *et al.* 2015; Geffroy 2013; Geffroy & Bardonnnet 2015; Krueger & Oliveira 1999), on pourrait supposer que les individus exprimant des profils transcriptomiques cérébraux particuliers (=équipés de certaines bases génétiques) peuvent passer les obstacles et ainsi présenteraient une plus forte probabilité de devenir femelle. La surexpression de l'aromatase, hormone responsable entre

autres de la transformation du testostérone en œstradiol et donc de la féminisation du cerveau (Diotel *et al.* 2010; Garcia-Segura 2008; Le Page *et al.* 2010), a été trouvée chez les individus en amont (Podgorniak *et al.* 2015a), renforçant ainsi cette hypothèse. Dans cette perspective, si l'aptitude phénotypique de femelles serait plus forte que celle des mâles (p. ex. la probabilité d'une reproduction réussie ou le succès reproducteur forts), la contribution des profils génétiques « amont » à la génération suivante serait plus forte que celle des profils « aval »³. Une conjecture alternative concerne la survie plus faible de individus amont par rapport à ceux en aval, et ceci indépendamment du sexe. Par exemple, lors de la migration de reproduction, les individus en amont doivent traverser les obstacles dans le sens inverse ce qui, dans le cas des installations hydroélectriques, est lié à une forte mortalité due au passage par les turbines (Boubee & Williams 2006; Gomes & Larinier 2008; Travade *et al.* 2010). Dans ce cas, les mesures prises pour améliorer la connectivité dans le sens aval-amont dans les axes aquatiques segmentés par des barrages (équipement des passes à civelles, augmentation de l'attractivité des dispositifs, voire translocation des civelles), pourraient être contre-productives, car la zone amont serait en quelque sorte un **piège écologique** pour anguille (Agostinho *et al.* 2011; McLaughlin *et al.* 2012; Pelicice & Agostinho 2008). D'une génération à l'autre, le polymorphisme génétique de l'anguille pourrait être appauvri par la faible survie des profils génétiques propres aux individus « amont ». D'une manière générale, un piège écologique d'origine anthropique pourrait devenir par la suite un **piège évolutif**, si l'espèce n'a pas le temps de s'adapter à ces changements (Robertson *et al.* 2013). Dans le cas de l'anguille c'est particulièrement vrai, car même si le changement (i.e. construction et équipement des obstacles facilitant la connectivité dans un sens unique) se ferait sur un temps générationnel relativement long, la panmixie aurait empêché la mise en place de toute adaptation locale de l'espèce.

Un autre point méritant une discussion concerne les différences dans les profils comportementaux mis en évidence lors du test de la passe expérimentale. En effet, les individus exprimant un comportement de leader provenaient uniquement des segments situés

³ Bien que la reproduction de l'anguille européenne n'ait jamais pu être observée dans son habitat de fraie (Mer des Sargasses), on peut supposer que les œufs des femelles puissent être fécondés par plusieurs mâles au moyen d'une fécondation externe. On émet une hypothèse d'un succès reproducteur plus fort des femelles, qui pourrait être lié au sex-ratio (si biaisé vers les mâles) ou déduit soit de l'équation [coût/bénéfice] du sexe (théorie des traits d'histoire de vie ; les femelles investissant plus d'énergie dans la reproduction que les mâles, et leur survie pouvant être plus faible lors du parcours de la distance amont-aval des axes fragmentés, la composante compensatoire serait d'avantage liée au nombre de descendants que le sexe femelle peut générer), soit de l'équation [coût/bénéfice] gène-centrée, où même si le sex-ratio et la survie du génotype sont les mêmes quel que soit son sexe, le temps de maturation des femelles (= délai entre naissance et reproduction vu comme délai entre deux répliquations consécutives des gènes) est plus long que chez mâles.

en amont du premier obstacle. Ces individus peuvent avoir une fonction particulière dans la dynamique du groupe des civelles en cours de migration. En effet, la migration des jeunes stades d'anguille est vue comme un mouvement collectif, et tous les facteurs mentionnés jusqu'à présent dans la littérature qui influenceraient ce comportement, ne permettent toujours pas de prédire efficacement leur arrivée (observations personnelles). Si on regarde de plus près, ces facteurs concernent les paramètres abiotiques (les marées, cycle circadien, température) ou les variables intrinsèques des individus (réserves énergétiques, taux d'hormones thyroïdiennes circulantes, facteur de condition, stade ontogénétique). Or, la migration des civelles étant un mouvement de groupe, son comportement et sa dynamique pourraient être influencés par des paramètres intrinsèques non à l'individu mais aussi à la composition du groupe entier (Farine *et al.* 2015; Keiser & Pruitt 2014; Modlmeier *et al.* 2014). En effet, de nombreuses études ont contribué à la création du concept de l'**individu clé-de voûte** (Modlmeier *et al.* 2014) en démontrant que la présence d'un faible nombre d'individus, voire d'un seul individu avec des traits ou comportements particuliers pourrait changer drastiquement le comportement du groupe entier (King 2010). La littérature foisonne d'exemples dans ce sens (Collignon & Detrain 2010; Petit & Bon 2010; Pillot & Deneubourg 2010). Par exemple, chez certaines araignées sociales, l'ajout d'un individu extrêmement téméraire influence positivement le comportement d'audace du groupe entier (Pruitt & Keiser 2014). Il existe également un feedback social positif, où la composition des individus timides, avec une tendance à suivre des individus capables d'une initiative particulière, accentue le comportement de **leadership** chez les individus proactifs (Harcourt *et al.* 2009b). Le mouvement d'escalade observé chez les civelles en groupe pourrait être déclenché par les individus capables d'un comportement d'initiative, capacité d'exploration d'une nouvelle zone en dehors du milieu aquatique habituel et sans besoin de présence préalable de congénères. Ces leaders permettront ensuite de déclencher un mouvement d'escalade en masse, auto-entretenu par la mise en place des stimuli sociaux provenant des congénères déjà en mouvement et facilité par l'information sociale sur l'environnement. Dans ce contexte, les individus retrouvés en aval constituent un groupe potentiel des followers, dépourvu la plupart de temps des leaders. En effet, ces derniers, dès qu'ils arrivent au pied de l'obstacle, tentent de l'escalader, entraînant une partie des followers, individus timides et à faible tendance à initier un comportement « à risque ». Le reste des individus timides ayant loupé leur « fenêtre » de migration (i.e. conditionnée par la présence d'un leader) attendra une nouvelle arrivée d'un individu proactif, potentiellement leader d'une nouvelle vague d'ascension. Il est également possible qu'au fur et à mesure des passages des obstacles successifs, tous les

individus acquièrent de l'expérience (apprentissage, mémoire spatiale), et exprimeront en conséquence une tendance à escalader plus forte. Le passage par les obstacles, initié en bonne compagnie et suffisamment répété, deviendrait –t-il un « jeu d'enfants » pour les civelles ? Il serait intéressant de vérifier de manière expérimentale la dynamique du comportement d'escalade du groupe entier avec et sans leaders, le groupe sans leaders mettant probablement plus de temps à initier l'ascension. Dans cette perspective, les variations temporelles de la dynamique de la migration sur les axes fragmentés pourraient être façonnées par la présence des individus capables d'initier l'escalade de manière spontanée, les leaders. Si une cohorte nouvellement arrivée au pied de l'obstacle ne contient pas de leaders, alors le groupe restera plus longtemps en aval (la densité croissante ou d'autres facteurs pouvant peut être déclenché une ascension spontanée des followers) ou attendra l'arrivée d'une nouvelle cohorte contenant des individus proactifs, téméraires et leaders. Le comportement de leader pouvant émerger aussi par l'expérience acquise (King 2010; King *et al.* 2009), une application pourrait être envisagée pour « aider » les civelles/anguillettes à coloniser plus rapidement les parties amont, et ainsi éviter l'accumulation au pied d'obstacles et la probabilité de sédentarisation trop importante (car liée à l'âge et stade ontogénétique). En effet, chez les pigeons, la probabilité d'émergence d'un leader dans un groupe est positivement liée à la différence d'expérience entre les individus du groupe (Flack *et al.* 2012). Mis dans notre contexte d'étude et équipés d'une certaine dose d'imagination, nous pourrions suggérer qu'un apport des individus ayant acquis de l'expérience de passage par obstacle - retrouvés en amont de l'axe ou entraînés en conditions expérimentales - dans les groupes d'individus en aval – encore naïfs aux obstacles, permettrait d'accélérer et faciliter le mouvement migratoire de toute la cohorte et ainsi mieux étaler l'occupation du milieu d'eau douce par l'anguille.

Plusieurs perspectives d'étude ont émergé lors de cette étude (Figure 21). Pour déterminer si la distribution des profils phénotypiques différents en amont et en aval des obstacles est le résultat d'une régulation différentielle de l'expression des gènes lors du passage par obstacle (induction) ou de la sélection des profils préexistants, une analyse du tissu cervical chez le même individu avant et après le passage par obstacle serait nécessaire. Cependant, l'extraction du cerveau étant létale, une solution alternative pourrait apporter une partie de la réponse. On pourrait effectuer une analyse des SNP (Single Nucleotide Polymorphism, p.ex. par puce à SNP) sur un group d'individus présent an aval et en amont de l'obstacle. Si la variation du polymorphisme nucléotidique n'est pas la même entre les groupes et si les SNP sont situées sur les régions codantes des gènes d'intérêt ou associées

p.ex. aux facteurs de transcription de ces gènes, alors on pourrait suggérer une sélection artificielle de la part des obstacles. Une autre étude mise en perspective concerne le suivi chronologique des profils moléculaires pendant le développement ontogénique de l'individu ou le développement du cerveau (si ce dernier possède une croissance allométrique). Là encore, idéalement, l'analyse devrait être faite sur le même individu. Dans le cas de notre étude, l'otolithométrie n'a pas indiqué des différences d'âge entre les individus testées, mais notre analyse concernait uniquement les stries annuelles, les stries mensuelles ou journalières étaient difficilement détectables.

Afin de savoir plus précisément quelles fonctions exactes étaient contrôlées par les gènes détectés, plusieurs axes de recherche peuvent être proposés, notamment, une analyse des régions spécifiques du cerveau couplée avec des tests de perception, de mémoire ou de flexibilité comportementale au niveau de l'organisme entier (p.ex. test de type *reversal learning*, *associative learning*, *water maze orientation*), ou encore avec des tests de certains traits liés à la personnalité animale (sociabilité, activité). Les résultats de l'expérience de Common Garden nous ont indiqué que les différences de transcription de gènes entre les individus sont visibles même dans des conditions environnementales strictement homogènes. Ainsi, on peut supposer que ces profils ont une base génétique ou épigénétique. Le mécanisme épigénétique peut être particulièrement intéressant, car il peut être impliqué dans l'expression d'une norme de réaction stable tout le long la vie de l'individu (p.ex. plasticité développementale), mais aussi, dans certains cas, transmis à la génération suivante. Qu'il s'agisse de l'épigénétique ou de la génétique, la seule manière de savoir si les différences observées sont héréditaires est de réaliser des croisements contrôlés. Là encore, des contraintes s'imposent. En effet, la reproduction assistée de l'anguille européenne n'a pas encore permis d'obtenir des descendants viables. Une autre perspective de cette thèse concerne l'effet de la distance nagée sur les profils moléculaires détectés. En effet, la différence entre les individus amont et les individus aval du corridor aquatique fragmenté concerne non seulement le passage réussi des obstacles, mais aussi la distance de nage que chaque individu a dû effectuer. Bien que cette distance fût très faible dans le cas de notre étude, une étude d'une plus grande envergure pourrait être envisagée sur d'autres sites, où la distance entre les obstacles est d'ordre de dizaines de kilomètres. Ce type d'étude aurait également permis de généraliser nos résultats. Cependant, là encore, une contrainte déjà mentionnée s'ajoute à nouveau. La distance de nage plus grande signifie également le temps de nage (i.e. différence

d'âge) plus important. Ainsi, l'analyse préliminaire de la dynamique des profils moléculaires en fonction de l'âge et du développement du cerveau des individus serait nécessaire.

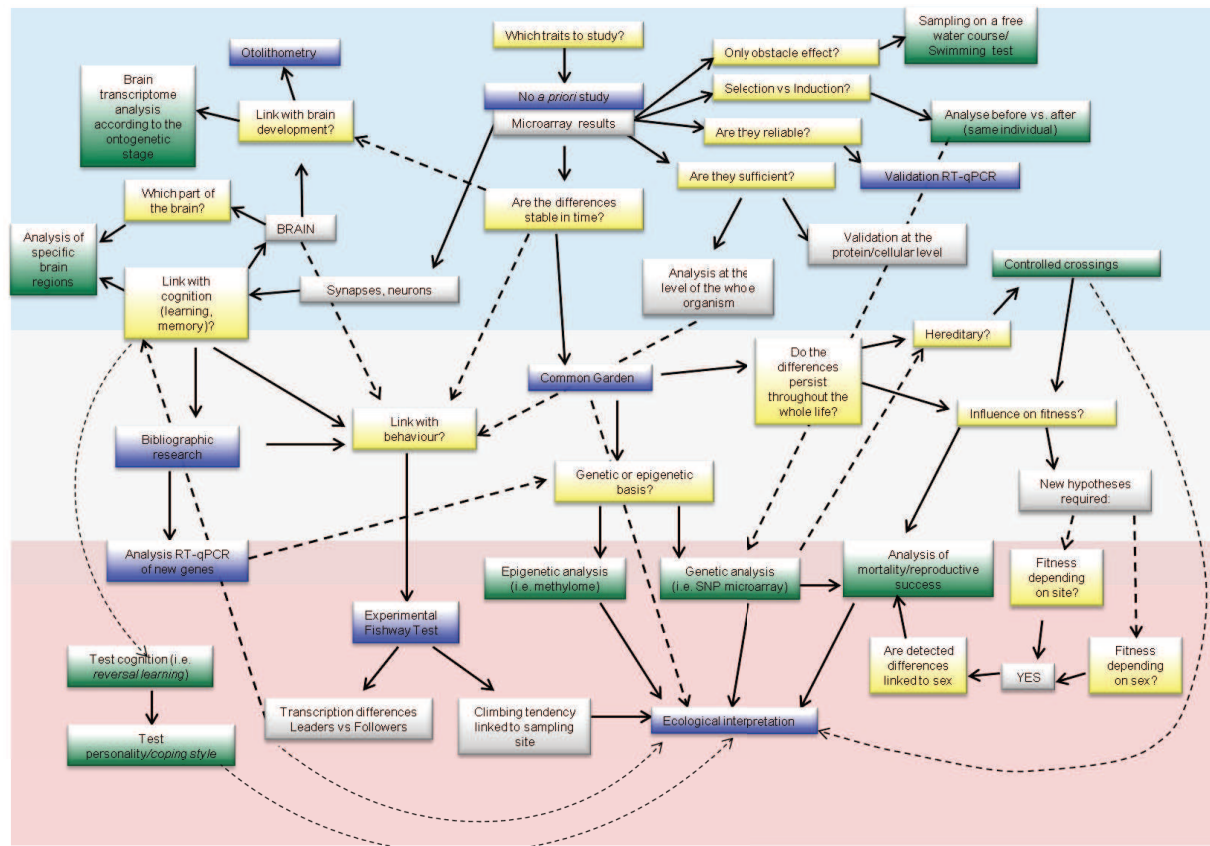


Figure 21) Schéma de la démarche suivie le long de la thèse. Les rectangles bleus correspondent aux analyses effectuées, les rectangles jaunes correspondent aux questions posées, et les rectangles verts aux perspectives d'étude. Les rectangles sont positionnés sur trois zones de couleur de fond différente, permettant de les situer chronologiquement (bleu= 1^e année, blanc=2^e année, rouge=3^e année de thèse).

CHAPITRE 7 :

Bibliographie

- Adam G, Feunteun É, Prouzet P, Rigaud C (2008) L'anguille européenne, Indicateurs d'abondance et de colonisation, p. 393 p. Quae.
- Agostinho AA, Marques EE, Agostinho CS, de Almeida DA, de Oliveira RJ, de Melo JRB (2007) Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes? *Neotropical Ichthyology* **5**, 121-130.
- Agostinho CS, Pelicice FM, Marques EE, Soares AB, de Almeida DAA (2011) All that goes up must come down? Absence of downstream passage through a fish ladder in a large Amazonian river. *Hydrobiologia* **675**, 1-12.
- Aigoui I, Dufour M (2008) Guides Passes à poissons. (ed. (CETMEF) VNdFVeCdETMeF), p. 75p.
- Als TD, Hansen MM, Maes GE, Castonguay M, Riemann L, Aarestrup K, Munk P, Sparholt H, Hanel R, Bernatchez L (2011) All roads lead to home: Panmixia of European eel in the Sargasso Sea. *Molecular Ecology* **20**, 1333-1346.
- Alvarez-Vazquez LJ, Martinez A, Vazquez-Mendez ME, Vilar MA (2011) The importance of design in river fishways. In: *Ecological Engineering: From Concepts to Applications, Paris 2009* (eds. Lata JC, Lacroix G, Barot S), pp. 6-10.
- Arribas C, Fernández-Delgado C, Oliva-Paterna FJ, Drake P (2012) Oceanic and local environmental conditions as forcing mechanisms of the glass eel recruitment to the southernmost European estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **107**, 46-57.
- Aubin-Horth N, Renn SCP (2009) Genomic reaction norms: Using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Molecular Ecology* **18**, 3763-3780.
- Avramidou EV, Ganopoulos IV, Doulis AG, Tsiftaris AS, Aravanopoulos FA (2015) Beyond population genetics: natural epigenetic variation in wild cherry (*Prunus avium*). *Tree Genetics and Genomes* **11**.
- Bach JM, Lelievre M, Postic A, Viallard J (2007) Mesure de la colonisation par l'anguille européenne du bassin de la Loire et de ses affluents par suivi du réseau de stations de comptage, p. 22 p. Rapport Bilan INDICANG, LOGRAMI.
- Baltazar-Soares M, Biastoch A, Harrod C, Hanel R, Marohn L, Prigge E, Evans D, Bodles K, Behrens E, Böning CW, Eizaguirre C (2014) Recruitment collapse and population structure of the european eel shaped by local ocean current dynamics. *Current Biology* **24**, 104-108.
- Bardonnet A, Riera P (2005) Feeding of glass eels (*Anguilla anguilla*) in the course of their estuarine migration: New insights from stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **63**, 201-209.
- Beckmann C, Biro PA (2013) On the Validity of a Single (Boldness) Assay in Personality Research. *Ethology* **119**, 937-947.
- Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM, Van Oortmerssen GA (1991) Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia* **47**, 1008-1019.
- Benus RF, Den Daas S, Koolhaas JM, Van Oortmerssen GA (1990) Routine formation and flexibility in social and non-social behaviour of aggressive and non-aggressive male mice. *Behaviour* **112**, 176-193.
- Bernatchez L, St-Cyr J, Normandeau E, Maes GE, Als TD, Kalujnaia S, Cramb G, Castonguay M, Hansen MM (2011) Differential timing of gene expression regulation between leptocephali of the two *Anguilla* eel species in the Sargasso Sea. *Ecology and Evolution* **1**.

- Bodin N, Tapie N, Le Ménach K, Chassot E, Elie P, Rochard E, Budzinski H (2014) PCB contamination in fish community from the Gironde estuary (France): Blast from the past. *Chemosphere* **98**, 66-72.
- Bolhuis JE, Schouten WGP, Leeuw JAD, Schrama JW, Wiegant VM (2004) Individual coping characteristics, rearing conditions and behavioural flexibility in pigs. *Behavioural Brain Research* **152**, 351-360.
- Bonhommeau S, Blanke B, Tréguier AM, Grima N, Rivot E, Vermard Y, Greiner E, Le Pape O (2009) How fast can the European eel (*Anguilla anguilla*) larvae cross the Atlantic Ocean? *Fish Oceanogr* **18**, 371-385.
- Bonhommeau S, Chassot E, Rivot E (2008) Fluctuations in European eel (*Anguilla anguilla*) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso Sea. *Fisheries Oceanography* **17**, 32-44.
- Bossdorf O, Richards CL, Pigliucci M (2008) Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters* **11**, 106-115.
- Boubee JAT, Williams EK (2006) Downstream passage of silver eels at a small hydroelectric facility. *Fisheries Management and Ecology* **13**, 165-176.
- Bousquet CAH, Petit O, Arrivé M, Robin JP, Sueur C (2015) Personality tests predict responses to a spatial-learning task in mallards, *Anas platyrhynchos*. *Animal Behaviour* **110**, 145-154.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Progress in Neurobiology* **76**, 99-125.
- Briand C, Fatin D, Legault A (2002) Role of eel odour on the efficiency of an eel, *Anguilla anguilla*, ladder and trap. *Environmental Biology of Fishes* **65**, 473-477.
- Brown C, Braithwaite VA (2005) Effects of predation pressure on the cognitive ability of the poeciliid *Brachyrhaphis episcopi*. *Behavioral Ecology* **16**, 482-487.
- Brown GE (2003) Learning about danger: Chemical alarm cues and local risk assessment in prey fishes. *Fish and Fisheries* **4**, 227-234.
- Bshary R, Gingins S, Vail AL (2014) Social cognition in fishes. *Trends in Cognitive Sciences* **18**, 465-471.
- Bunt CM (2001) Fishway entrance modifications enhance fish attraction. *Fisheries Management and Ecology* **8**, 95-105.
- Bunt CM, Castro-Santos T, Haro A (2012) Performance of fish passage structures at upstream barriers to migration. *River research and application* **28**, 457-478.
- Bureau du Colombier S (2008) *Place du statut énergétique dans la dynamique migratoire de la civelle d'anguille européenne (Anguilla anguilla)* PhD, Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- Bureau du Colombier S, Bolliet V, Lambert P, Bardonnet A (2007) Energy and migratory behaviour in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Physiology and behaviour* **92**, 684-690.
- Bureau du Colombier S, Lambert P, Bardonnet A (2008) Is feeding behaviour related to glass eel propensity to migrate? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **80**, 323-329.
- Burnett NJ, Hinch SG, Braun DC, Casselman NJ, Middleton CT, Wilson SM, Cooke SJ (2014) Burst swimming in areas of high flow: Delayed consequences of anaerobiosis in wild adult sockeye salmon. *Physiological and Biochemical Zoology* **87**, 587-598.
- Cantrelle I (1984) Le marquage par coloration appliqué à l'étude des migrations des civelles (*Anguilla anguilla*, Pisces, Anguillidae). *Cybium* **8**, 69-78.
- Carpenter RE, Sabirzhanov I, Arendt DH, Smith JP, Summers CH (2008) Brain derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus (dorsolateral pallium) of rainbow trout is differentially regulated by coping strategy, revealed in a new model of fear conditioning. *Soc Neurosci Abs* **11**, 292.
- Castonguay M, Dutil JD, Audet C, Miller R (1990) Locomotor activity and concentration of thyroid hormones in migratory and sedentary juvenile American eels. *Transactions of the American Fisheries Society* **119**, 946-956.
- Castonguay M, McCleave JD (1987) Vertical distributions, diel and ontogenetic vertical migrations and net avoidance of leptocephali of *Anguilla* and other common species in the Sargasso Sea. *Journal of Plankton Research* **9**, 195-214.

- Castro-Santos T (2004) Quantifying the combined effects of attempt rate and swimming capacity on passage through velocity barriers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **61**, 1602-16015.
- Castro-Santos T, Haro A (2003) Quantifying migratory delay: A new application of survival analysis methods. *CANADIAN JOURNAL OF FISHERIES AND AQUATIC SCIENCES* **60**, 986-996.
- Charlon N, Blanc JM (1983) A study of the elvers, *Anguilla anguilla* L., in the Adour Basin area. Food intake and variations of biochemical characteristics from the outset of migration). *Archiv für Hydrobiologie* **98**, 240-249.
- Chaube R, Joy KP (2002) Effects of altered photoperiod and temperature, serotonin-affecting drugs, and melatonin on brain tyrosine hydroxylase activity in female catfish, *Heteropneustes fossilis*: A study correlating ovarian activity changes. *Journal of Experimental Zoology* **293**, 585-593.
- Clayton DF (2000) The genomic action potential. *Neurobiology of Learning and Memory* **74**, 185-216.
- Collignon B, Detrain C (2010) Distributed leadership and adaptive decision-making in the ant tetramorium caespitum. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**, 1267-1273.
- Coppe A, Pujolar JM, Maes GE, Larsen PF, Hansen MM, Bernatchez L, Zane L, Bortoluzzi S (2010) Sequencing, de novo annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered european eel. *Bmc Genomics* **11**.
- Coppens CM, De Boer SF, Koolhaas JM (2010) Coping styles and behavioural flexibility: Towards underlying mechanisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 4021-4028.
- Côté CL, Castonguay M, Kalujnaia MS, Cramb G, Bernatchez L (2014) In absence of local adaptation, plasticity and spatially varying selection rule: A view from genomic reaction norms in a panmictic species (*Anguilla rostrata*). *Bmc Genomics* **15**.
- Côté CL, Castonguay M, Verreault G, Bernatchez L (2009) Differential effects of origin and salinity rearing conditions on growth of glass eels of the American eel *Anguilla rostrata*: Implications for stocking programmes. *Journal of Fish Biology* **74**, 1934-1948.
- Côté CL, Pavey SA, Stacey JA, Pratt TC, Castonguay M, Audet C, Bernatchez L (2015) Growth, Female Size, and Sex Ratio Variability in American Eel of Different Origins in Both Controlled Conditions and the Wild: Implications for Stocking Programs. *Transactions of the American Fisheries Society* **144**, 246-257.
- Cote D, Kehler DG, Bourne C, Wiersma YF (2009) A new measure of longitudinal connectivity for stream networks. *Landscape Ecology* **24**, 101-113.
- Cren L (1951) The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). *The Journal of Animal Ecology* **20**, 201.
- Creutzberg F (1959) Discrimination between ebb and flood tide in migrating elvers (*Anguilla vulgaris* Turt.) by means of olfactory perception. *Nature* **184**, 1961-1962.
- Creutzberg F (1961) On the orientation of migrating elvers (*Anguilla vulgaris* turt.) in a tidal area. *Netherlands Journal of Sea Research* **1**, 257-302, IN251-IN252, 303-324, IN253-IN254, 325-338.
- Crews D, Gore AC (2014) Chapter 26 - Transgenerational Epigenetics: Current Controversies and Debates. In: *Transgenerational Epigenetics* (ed. Tollefsbol T), pp. 371-390. Academic Press, Oxford.
- Crispo E (2007) The Baldwin effect and genetic assimilation: Revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity. *Evolution* **61**, 2469-2479.
- Croze O, Larinier M (2007) Mitigation de l'impact des seuils et barrages sur la circulation des poissons migrateurs en rivière : solutions techniques et limites (ed. environnementale CGamefTndcei), pp. 155-159. SHF –AIPCN – CETMEF, Paris.
- Daemen E, Cross T, Ollevier F, Volckaert FAM (2001) Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers. *Marine Biology* **139**, 755-764.

- Dambrine F (2006) Perspectives de développement de la production hydroélectrique en France. *Rapport du Ministère de l'Economie, des Finances et de l'Industrie*, 56 pp.
- Dammerman KJ, Steibel JP, Scribner KT (2015) Genetic and environmental components of phenotypic and behavioral trait variation during lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) early ontogeny. *Environmental Biology of Fishes* **98**, 1659-1670.
- Dannewitz J, Maes GE, Johansson L, Wickstrom H, Volckaert FAM, Jarvi T (2005) Panmixia in the European eel: A matter of time... *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* **272**, 1129-1137.
- Daverat F, Limburg KE, Thibault I, Shiao JC, Dodson JD, Caron F, Tzeng W-N, Iizuka Y, Wickström H (2006a) Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. *Marine Ecology-Progress Series* **308**, 231-241.
- Daverat F, Limburg KE, Thibaut I, Shiao JC, Dodson JJ, Caron F, Tzeng W-N, Iizuka Y, Wickström H (2006b) Phenotypic plasticity of habitat use by three temperate eel species *Anguilla anguilla*, *A. japonica* and *A. rostrata*. *Marine Ecology Progress Series* **308**, 231-241.
- Daverat F, Tomas J (2006) Tactics and demographic attributes of the European eel (*Anguilla anguilla*): the case study of the Gironde watershed (Southwest France). *Marine Ecology Progress Series* **307**, 247-257.
- Daverat F, Tomas J, Lahaye M, Palmer M, Elie P (2005) Tracking continental habitat shifts of eels using otolith Sr/Ca ratios: validation and application to the coastal, estuarine and riverine eels of the Gironde–Garonne–Dordogne watershed. *Marine and Freshwater Research* **56**, 619–627.
- Davey A, Jellyman D (2005) Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **15**, 37-52.
- Dawkins R (1989) *The Selfish Gene* Oxford University Press.
- Day JJ, Sweatt JD (2011) Epigenetic Mechanisms in Cognition. *Neuron* **70**, 813-829.
- Day RL, MacDonald T, Brown C, Laland KN, Reader SM (2001) Interactions between shoal size and conformity in guppy social foraging. *Animal Behaviour* **62**, 917-925.
- De Meyer J, Ide C, Belpaire C, Goemans G, Adriaens D (2015) Head shape dimorphism in European glass eels (*Anguilla anguilla*). *Zoology*.
- Degani G, Levanon D (1983) The influence of low density on food adaptation, cannibalism and growth of eels (*Anguilla anguilla* (L.)). *Bamidgeh* **35**, 53-60.
- Dekker W (2003) Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* **10**, 365-376.
- Derome N, Duchesne P, Bernatchez L (2006) Parallelism in gene transcription among sympatric lake whitefish (*Coregonus clupeaformis* Mitchill) ecotypes. *Molecular Ecology* **15**, 1239-1249.
- Desaunay Y, Guerauld D (1997) Seasonal and long-term changes in biometrics of eel larvae: A possible relationship between recruitment variation and North Atlantic ecosystem productivity. *Journal of Fish Biology* **51**, 317-339.
- Dias MS, Cornu JF, Oberdorff T, Lasso CA, Tedesco PA (2013) Natural fragmentation in river networks as a driver of speciation for freshwater fishes. *Ecography* **36**, 683-689.
- Dingemanse NJ, Kazem AJN, Réale D, Wright J (2010) Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 81-89.
- Diotel N, Le Page Y, Mouriec K, Tong SK, Pellegrini E, Valliant C, Anglade I, Brion F, Pakdel F, Chung BC, Kah O (2010) Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* **31**, 172-192.
- Domingos I, Costa JL, Costa MJ (2006) Factors determining length distribution and abundance of the European eel, *Anguilla anguilla*, in the River Mondego (Portugal). *Freshwater Biology* **51**, 2265-2281.
- Durif C, Elie P, Gosset C, Rives J, Travade F (2003) Behavioral study of downstream migrating eels by radio-telemetry at a small hydroelectric power plant. In: *Biology, Management and Protection of Catadromous Eels* (ed. Dixon DA), pp. 343-356. American Fisheries Society Symposium, Bethesda, Maryland, USA.

- Durif CMF, Browman HI, Phillips JB, Skiftesvik AB, Vøllestad LA, Stockhausen HH (2013) Magnetic Compass Orientation in the European Eel. *PLoS ONE* **8**.
- Durif CMF, Gjørseter J, Vøllestad LA (2011) Influence of oceanic factors on *Anguilla anguilla* (L.) over the twentieth century in coastal habitats of the Skagerrak, southern Norway. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**, 464-473.
- Edeline E (2007) Adaptive phenotypic plasticity of eel diadromy. *Marine Ecology Progress Series* **341**, 229-232.
- Edeline E, Bardonnnet A, Bolliet V, Dufour S, Elie P (2005) Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: Effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behavior. *Hormones and Behavior* **48**, 53-63.
- Edeline E, Dufour S, Briand C, Fatin D, Elie P (2004) Thyroid status is related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. *Marine Ecology Progress Series* **282**, 261-270.
- Edeline E, Dufour S, Elie P (2009) Proximate and Ultimate Control of Eel Continental Dispersal. In: *Spawning Migration of the European Eel*, pp. 433-461. Springer Netherlands.
- Edeline E, Lambert P, Rigaud C, Elie P (2006) Effects of body condition and water temperature on *Anguilla anguilla* glass eel migratory behavior. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **331**, 217-225.
- Efferson C, Lalive R, Richerson PJ, McElreath R, Lubell M (2008) Conformists and mavericks: the empirics of frequency-dependent cultural transmission. *Evolution and Human Behavior* **29**, 56-64.
- Elie P, Rochard E (1994) Migration des civelles d'anguilles (*Anguilla anguilla* L.) dans les estuaires, modalité du phénomène et caractéristiques des individus. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **335**, 81-98.
- Farine DR, Montiglio PO, Spiegel O (2015) From Individuals to Groups and Back: The Evolutionary Implications of Group Phenotypic Composition. *Trends in Ecology and Evolution* **30**, 609-621.
- Fay JC, Wittkopp PJ (2008) Evaluating the role of natural selection in the evolution of gene regulation. *Heredity* **100**, 191-199.
- Feunteun E (2002) Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. *Ecological Engineering* **18**, 575-591.
- Feunteun E, Laffaille P, Robinet T, Briand C, Baisez A, Olivier JM, Acou A (2003) A review of upstream migration and movements in inland waters by anguillid eels. Towards a general theory. In: *Eel Biology* (eds. Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K), pp. 191-213. Springer-Verlag, Tokyo.
- Flack A, Pettit B, Freeman R, Guilford T, Biro D (2012) What are leaders made of? The role of individual experience in determining leader–follower relations in homing pigeons. *Animal Behaviour* **83**, 703-709.
- Fontaine M, Callamand O (1941) Sur certains facteurs des migrations de l'anguille. *Bulletin de la Société Zoologique de France* **66**, 68-76.
- Foulds WL, Lucas MC (2013) Extreme inefficiency of two conventional, technical fishways used by European river lamprey (*Lampetra fluviatilis*). *Ecological Engineering* **58**, 423-433.
- Gagnaire PA, Normandeau E, Côté C, Hansen MM, Bernatchez L (2012) The genetic consequences of spatially varying selection in the panmictic american eel (*Anguilla rostrata*). *Genetics* **190**, 725-736.
- Garcia-Segura LM (2008) Aromatase in the brain: Not just for reproduction anymore. *Journal of Neuroendocrinology* **20**, 705-712.
- Garcia De Leaniz C (2008) Weir removal in salmonid streams: Implications, challenges and practicalities. *Hydrobiologia* **609**, 83-96.
- Garenc C, Silversides FG, Guderley H (1998) Burst swimming and its enzymatic correlates in the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): full-sib heritabilities. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **76**, 680-688.
- Gascuel D (1986) Flow carried and active swimming migration of the glass eel (*Anguilla anguilla*) in the tidal area of a small estuary on the French Atlantic coast. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **40**, 321-326.

- Geffroy B (2013) Déterminisme environnemental du sexe chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.). In: *Rapport de These*, p. 408.
- Geffroy B, Bardonnnet A (2012) Differential effects of behaviour, propensity to migrate and recruitment season on glass eels and elvers' growing performance. *Ecology of Freshwater Fish* **21**, 469-482.
- Geffroy B, Bardonnnet A (2015) Sex differentiation and sex determination in eels: Consequences for management. *Fish and Fisheries*.
- Geffroy B, Sadoul B, Bardonnnet A (2015) Behavioural syndrome in juvenile eels and its ecological implications. *Behaviour* **152**, 147-166.
- Gephard S, McMenemy J (2004) An overview of the program to restore Atlantic salmon and other diadromous fishes to the Connecticut River with notes on the current status of these species in the river. *American Fisheries Society Monograph* **9**, 287-317.
- Giger T, Excoffier L, Day PJR, Champigneulle A, Hansen MM, Powell R, Largiadèr CR (2006) Life history shapes gene expression in salmonids. *Current Biology* **16**, R281-R282.
- Gomes P, Larinier M (2008) Dommage subis par les anguilles lors de leur passage au travers des turbines Kaplan - Etablissement de formules prédictives, p. 70. GHAAPE.
- Gonda A, Herczeg G, Merilä J (2011) Population variation in brain size of nine-spined sticklebacks (*Pungitius pungitius*) - Local adaptation or environmentally induced variation? *BMC evolutionary biology* **11**.
- Gräff J, Mansuy IM (2008) Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural Brain Research* **192**, 70-87.
- Grassi GB (1896) *The Reproduction and Metamorphosis of the Common Eel (Anguilla Vulgaris)* J. & A. Churchill.
- Grativol C, Hemerly AS, Ferreira PCG (2012) Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**, 176-185.
- Hale ME, Long Jr JH, McHenry MJ, Westneat MW (2002) Evolution of behavior and neural control of the fast-start escape response. *Evolution* **56**, 993-1007.
- Hansen MM (2010) Expression of interest: Transcriptomics and the designation of conservation units. *Molecular Ecology* **19**, 1757-1759.
- Harcourt JL, Ang TZ, Sweetman G, Johnstone RA, Manica A (2009a) Leadership, personality and social feedback. *Communicative and Integrative Biology* **2**, 335-336.
- Harcourt JL, Ang TZ, Sweetman G, Johnstone RA, Manica A (2009b) Social Feedback and the Emergence of Leaders and Followers. *Current Biology* **19**, 248-252.
- Hasler CT, Pon LB, Roscoe DW, Mossop B, Patterson DA, Hinch SG, Cooke SJ (2009) Expanding the "toolbox" for studying the biological responses of individual fish to hydropower infrastructure and operating strategies. *Environmental Reviews* **17**, 179-197.
- Helfman GS, Facey DE, Hales SJ, Bozeman ELJ (1987) Reproductive ecology of the American eel. *American Fisheries Society Symposium* **1**, 42-56.
- Hickman RA (1981) Densities and swimbladder development of juvenile American eels, *Anguilla rostrata* (Lesueur) as related to energetics of migration. *Journal of Fish Biology* **18**, 507-517.
- Hinch SG, Bratty J (2000) Effects of swim speed and activity pattern on success of adult sockeye salmon migration through an area of difficult passage. *Transactions of the American Fisheries Society* **129**, 598-606.
- Hurtado-Parrado C (2010) Neuronal mechanisms of learning in teleost fish. *Universitas Psychologica* **9**, 663-678.
- Hutchings JA (2011) Old wine in new bottles: Reaction norms in salmonid fishes. *Heredity* **106**, 421-437.
- Hutchings JA, Swain DP, Rowe S, Eddington JD, Puvanendran V, Brown JA (2007) Genetic variation in life-history reaction norms in a marine fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**, 1693-1699.

- Ibbotson A, Smith J, Scarlett P, Aprhamian M (2002) Colonisation of freshwater habitats by the European eel *Anguilla anguilla*. *Freshwater Biology* **47**, 1696-1706.
- Ide C, De Schepper N, Christiaens J, Van Liefferinge C, Herrel A, Goemans G, Meire P, Belpaire C, Geeraerts C, Adriaens D (2011) Bimodality in head shape in European eel. *Journal of Zoology* **285**, 230-238.
- Imbert H, Arrowsmith R, Dufour S, Elie P (2008) Relationships between locomotor behavior, morphometric characters and thyroid hormone levels give evidence of stage-dependent mechanisms in European eel upstream migration. *Hormones and Behavior* **53**, 69-81.
- Jiang L, Zhang J, Wang JJ, Wang L, Zhang L, Li G, Yang X, Ma X, Sun X, Cai J, Huang X, Yu M, Wang X, Liu F, Wu CI, He C, Zhang B, Ci W, Liu J (2013) Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell* **153**, 773-784.
- Johansen IB, Sørensen C, Sandvik GK, Nilsson GE, Höglund E, Bakken M, Øverli O (2012) Neural plasticity is affected by stress and heritable variation in stress coping style. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* **7**, 161-171.
- Johnston IA, Dunn J (1987) Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **41**, 67-93.
- Jolles JW, Fleetwood-Wilson A, Nakayama S, Stumpe MC, Johnstone RA, Manica A (2015) The role of social attraction and its link with boldness in the collective movements of three-spined sticklebacks. *Animal Behaviour* **99**, 147-153.
- Juliana JRS, Janzen FJ (2007) Can natural phenotypic variances be estimated reliably under homogeneous laboratory conditions? *European Society for Evolutionary Biology* **20**, 1406-1414.
- Kalujnaia S, McWilliam IS, Zaguinaiko VA, Feilen AL, Nicholson J, Hazon N, Cutler CP, Balment RJ, Cossins AR, Hughes M, Cramb G (2007a) Salinity adaptation and gene profiling analysis in the European eel (*Anguilla anguilla*) using microarray technology. *General and Comparative Endocrinology* **152**, 274-280.
- Kalujnaia S, McWilliam IS, Zaguinaiko VA, Feilen AL, Nicholson J, Hazon N, Cutler CP, Cramb G (2007b) Transcriptomic approach to the study of osmoregulation in the European eel *Anguilla anguilla*. *Physiological Genomics* **31**, 385-401.
- Katopodis C (2005) Developing a toolkit for fish passage, ecological flow management and fish habitat works. *Journal of Hydraulic Research* **43**, 451-467.
- Katopodis C, Williams JG (2012) The development of fish passage research in a historical context. *Ecological Engineering* **48**, 8-18.
- Keiser CN, Pruitt JN (2014) Personality composition is more important than group size in determining collective foraging behaviour in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**.
- Kelleher Iii RJ, Govindarajan A, Tonegawa S (2004) Translational Regulatory Mechanisms in Persistent Forms of Synaptic Plasticity. *Neuron* **44**, 59-73.
- Kelley JL, Magurran AE (2003) Learned predator recognition and antipredator responses in fishes. *Fish and Fisheries* **4**, 216-226.
- Kemp SP (2012) Bridging the gap between behaviour, performance and hydrodynamics: an ecohydraulics approach to fish passage research. *River research and application* **28**, 403-406.
- Kettle AJ, Bakker DCE, Haines K (2008) Impact of the North Atlantic Oscillation on the trans-Atlantic migrations of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* **113**.
- King AJ (2010) Follow me! I'm a leader if you do; I'm a failed initiator if you don't? *Behavioural Processes* **84**, 671-674.
- King AJ, Johnson DDP, Van Vugt M (2009) The Origins and Evolution of Leadership. *Current Biology* **19**, R911-R916.
- Kirk RS (2003) The impact of *Anguillicola crassus* on European eels. *Fisheries Management and Ecology* **10**, 385-394.

- Knights B (2003) A review of the possible impacts of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. *The Science of the Total Environment* **310**, 237–244.
- Koolhaas JM, de Boer SF, Coppens CM, Buwalda B (2010) Neuroendocrinology of coping styles: Towards understanding the biology of individual variation. *Frontiers in Neuroendocrinology* **31**, 307–321.
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van Der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, De Jong IC, Ruis MAW, Blokhuis HJ (1999) Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **23**, 925–935.
- Kopp M, Matuszewski S (2014) Rapid evolution of quantitative traits: Theoretical perspectives. *Evolutionary Applications* **7**, 169–191.
- Krueger WH, Oliveira K (1999) Evidence for environmental sex determination in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Environmental Biology of Fishes* **55**, 381–389.
- Lande R (2009) Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of Evolutionary Biology* **22**, 1435–1446.
- Laporte M, Pavey SA, Rougeux C, Pierron F, Lauzent M, Budzinski H, Labadie P, Geneste E, Couture P, Baudrimont M, Bernatchez L (2015) RAD-sequencing reveals within-generation polygenic selection in response to anthropogenic organic and metal contamination in North Atlantic Eels. *Molecular Ecology*, n/a-n/a.
- Larinier M (1987) Fishways: Principles and Design Criteria. *Houille Blanche* **42**, 51–57.
- Larinier M (2001) Environmental issues, dams and fish migrations. In: *Dams, fish and fisheries: Opportunities, challenges and conflict resolution* (ed. Marmulla G), pp. 45–90. FAO Fisheries Technical Paper 419.
- Larinier M, Dartiguelongue J (1989) La circulation des poissons migrateurs : le transit à travers les turbines des installations hydroélectriques. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **312-313**, 1–90.
- Larsen PF, Nielsen EE, Williams TD, Hemmer-Hansen J, Chipman JK, Kruhøffer M, Grønkjær P, George SG, Dyrskjød L, Loeschcke V (2007) Adaptive differences in gene expression in European flounder (*Platichthys flesus*). *Molecular Ecology* **16**, 4674–4683.
- le Bras YM (1979) Circadian rhythm in brain catecholamine concentrations in the teleost: *Anguilla anguilla* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **62**, 115–117.
- Le Page Y, Diotel N, Vaillant C, Pellegrini E, Anglade I, Mérot Y, Kah O (2010) Aromatase, brain sexualization and plasticity: The fish paradigm. *European Journal of Neuroscience* **32**, 2105–2115.
- Lecomte-Finiger R, Maunier C, Khafif M (2004) Leptocephali, these unappreciated larvae. *Cybio* **28**, 83–95.
- Legault A (1986) Comportement d'escalade de l'anguille (*Anguilla anguilla*) et colonisation du bassin versant de la Sèvre Niortaise. Rapport Parc Naturel Régional du Marais Poitevin/Conseil Supérieur de la Pêche. *Les publications du département Halieutique de l'E.N.S.A. de Rennes*, 41p.
- Legault A (1988) Le franchissement des barrages par l'escalade de l'anguille étude en Sèvre Niortaise. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* **308**, 1–10.
- Leloup J (1958) Influence de la température sur le fonctionnement thyroïdien de l'Anguille normale *Comptes rendus de l'académie des sciences* **247**, 2454–2456.
- Lin YS, Poh YP, Tzeng CS (2001) A phylogeny of freshwater eels inferred from mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**, 252–261.
- Linton ED, Jónsson B, Noakes DLG (2007) Effects of water temperature on the swimming and climbing behaviour of glass eels, *Anguilla* spp. *Environmental Biology of Fishes* **78**, 189–192.
- Lisman J (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends in Neurosciences* **17**, 406–412.

- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 175-190.
- Lisman JE, McIntyre CC (2001) Synaptic plasticity: A molecular memory switch. *Current Biology* **11**, R788-R791.
- Liu SJ, Zukin RS (2007) Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends in Neurosciences* **30**, 126-134.
- Lucas MC, Baras E (2001) Migration of freshwater fishes (ed. Science OB), p. 420.
- Lynch MA (2004) Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews* **84**, 87-136.
- MacKenzie S, Ribas L, Pilarczyk M, Capdevila DM, Kadri S, Huntingford FA (2009) Screening for coping style increases the power of gene expression studies. *Plos One* **4**.
- Maes GE, Pujolar JM, Hellemans B, Volckaert FAM (2006) Evidence for isolation by time in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Molecular Ecology* **15**, 2095-2107.
- Maes GE, Van Vo B, Crivelli AJ, Volckaert FAM (2009) Morphological and genetic seasonal dynamics of European eel *Anguilla anguilla* recruitment in southern France. *Journal of Fish Biology* **74**, 2047-2068.
- Maes GE, Volckaert FAM (2002) Clinal genetic variation and isolation by distance in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Biological Journal of the Linnean Society* **77**, 509-521.
- Maes GE, Volckaert FAM (2007) Challenges for genetic research in European eel management. *ICES Journal of Marine Science* **64**, 1463-1471.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation - A decade of progress? *Science* **285**, 1870-1874.
- Markov G, Yiğit N, Çolak E, Kocheva M, Gospodinova M (2014) Intraspecific epigenetic polymorphism of the East European vole (*Microtus levis* Miller, 1908) in South-eastern Europe and Turkey. *Biologia (Poland)* **69**, 101-106.
- Marmulla G (2001) *Dams, fish and fisheries : opportunities, challenges and conflict resolution* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Marohn L, Jakob E, Hanel R (2013) Implications of facultative catadromy in *Anguilla anguilla*. Does individual migratory behaviour influence eel spawner quality? *Journal of Sea Research* **77**, 100-106.
- Marohn L, Prigge E, Hanel R (2014) Escapement success of silver eels from a German river system is low compared to management-based estimates. *Freshwater Biology* **59**, 64-72.
- Martinez M, Guderley H, Dutil JD, Winger PD, He P, Walsh SJ (2003) Condition, prolonged swimming performance and muscle metabolic capacities of cod *Gadus morhua*. *Journal of Experimental Biology* **206**, 503-511.
- Maruska KP, Becker L, Neboori A, Fernald RD (2013) Social descent with territory loss causes rapid behavioral, endocrine and transcriptional changes in the brain. *Journal of Experimental Biology* **216**, 3656-3666.
- McCleave JD, Kleckner RC (1982) Selective tidal stream transport in the estuarine migration of glass eels of the American eel (*Anguilla rostrata*). *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* **40**, 262-271.
- McCleave JD, Wippelhauser GS (1987) Behavioural aspects of selective tidal stream transport in juvenile American eels. *American Fisheries Society Symposium* **1**, 138-150.
- McCowan LSC, Griffith SC (2015) Active but asocial: Exploration and activity is linked to social behaviour in a colonially breeding finch. *Behaviour* **152**, 1145-1167.
- McDowall RM (1988) Diadromy in fishes - Migration between freshwater and marine environments, p. 307. Croom Helm, London.
- McLaughlin RL, Smyth ERB, Castro-Santos T, Jones ML, Koops MA, Pratt TC, Vélez-Espino LA (2012) Unintended consequences and trade-offs of fish passage. *Fish and Fisheries* **14**, 580-604.
- Miller MJ, Bonhommeau S, Munk P, Castonguay M, Hanel R, McCleave JD (2015) A century of research on the larval distributions of the Atlantic eels: A re-examination of the data. *Biological Reviews* **90**, 1035-1064.

- Minegishi Y, Aoyama J, Inoue JG, Miya M, Nishida M, Tsukamoto K (2005) Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**, 134-146.
- Mittelbach GG, Osenberg CW, Wainwright PC (1999) Variation in feeding morphology between pumpkinseed populations: Phenotypic plasticity or evolution? *Evolutionary Ecology Research* **1**, 111-128.
- Modlmeier AP, Keiser CN, Watters JV, Sih A, Pruitt JN (2014) The keystone individual concept: An ecological and evolutionary overview. *Animal Behaviour* **89**, 53-62.
- Morange M (2005) How to localize epigenetics in the landscape of biological research? *Medecine/Sciences* **21**, 367-369.
- Moriarty C (1986) Riverine migration of young eels *Anguilla anguilla* (L.). *Fisheries Research* **4**, 43-58.
- Moriarty C, Dekker W (1997) Management of the European Eel, p. 110p.
- Mueller T, O'Hara RB, Converse SJ, Urbanek RP, Fagan WF (2013) Social learning of migratory performance. *Science* **341**, 999-1002.
- Münderle M, Sures B, Taraschewski H (2004) Influence of *Anguillicola crassus* (Nematoda) and *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) on swimming activity of European eel *Anguilla anguilla*. *Diseases of Aquatic Organisms* **60**, 133-139.
- Munk P, Hansen MM, Maes GE, Nielsen TG, Castonguay M, Riemann L, Sparholt H, Als TD, Aarestrup K, Andersen NG, Bachler M (2010) Oceanic fronts in the Sargasso Sea control the early life and drift of Atlantic eels. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**, 3593-3599.
- Naismith IA, Knights B (1988) Migrations of elvers and juvenile European eels, *Anguilla anguilla* L., in the River Thames. *Journal of Fish Biology* **33**, 161-175.
- Naslund J, Bererhi B, Johnsson JI (2015) Design of Emergence Test Arenas Can Affect the Results of Boldness Assays. *Ethology* **121**, 556-565.
- Neildez-Nguyen TMA, Parisot A, Vignal C, Rameau P, Stockholm D, Picot J, Allo V, Le Bec C, Laplace C, Paldi A (2008) Epigenetic gene expression noise and phenotypic diversification of clonal cell populations. *Differentiation* **76**, 33-40.
- Nicola GG, Elvira B, Almodovar A (1996) Dams and fish passage facilities in the large rivers of Spain: effects on migratory species. *Archiv für Hydrobiologie* **113**, 375-379.
- Niemelä PT, Vainikka A, Forsman JT, Loukola OJ, Kortet R (2013) How does variation in the environment and individual cognition explain the existence of consistent behavioral differences? *Ecology and Evolution* **3**, 457-464.
- Noonan MJ, Grant JWA, Jackson CD (2012) A quantitative assessment of fish passage efficiency. *Fish and Fisheries* **13**, 450-464.
- Northcote TG, Lobón-Cerviá J (2008) Increasing experimental approaches in stream trout research - 1987-2006. *Ecology of Freshwater Fish* **17**, 349-361.
- Nowosad J, Kucharczyk D, Czarkowski TK, Kwasek K (2014) Changes in body weight and eye size in female European eel kept in fresh and salt water. *Italian Journal of Animal Science* **13**, 382-386.
- Odling-Smee LC, Boughman JW, Braithwaite VA (2008) Sympatric species of threespine stickleback differ in their performance in a spatial learning task. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **62**, 1935-1945.
- Oliveira K, McCleave JD (2000) Variation in population and life history traits of the American eel, *Anguilla rostrata*, in four rivers in Maine. *Environmental Biology of Fishes* **59**, 141-151.
- Oliveira RF (2012) Social plasticity in fish: integrating mechanisms and function. *Journal of Fish Biology* **81**, 2127-2150.
- Oltvai ZN, Barabási AL (2002) Systems biology: Life's complexity pyramid. *Science* **298**, 763-764.
- Øverli Ø, Sørensen C, Nilsson GE (2006) Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: Do males and females react differently to novelty? *Physiology and Behavior* **87**, 506-512.
- Øverli Ø, Sørensen C, Pulman KGT, Pottinger TG, Korzan W, Summers CH, Nilsson GE (2007) Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological,

- behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **31**, 396-412.
- Panja D, Bramham CR (2014) BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology* **76, Part C**, 664-676.
- Papa M, Pellicano MP, Welzl H, Sadile AG (1993) Distributed changes in c-Fos and c-Jun immunoreactivity in the rat brain associated with arousal and habituation to novelty. *Brain Research Bulletin* **32**, 509-515.
- Pavey SA, Gaudin J, Normandeau E, Dionne M, Castonguay M, Audet C, Bernatchez L (2015) RAD Sequencing Highlights Polygenic Discrimination of Habitat Ecotypes in the Panmictic American Eel. *Current Biology* **25**, 1666-1671.
- Pellicice FM, Agostinho AA (2008) Fish-passage facilities as ecological traps in large neotropical rivers. *Conservation Biology* **22**, 180-188.
- Pépino M, Rodríguez MA, Magnan P (2012) Fish dispersal in fragmented landscapes: A modeling framework for quantifying the permeability of structural barriers. *Ecological Applications* **22**, 1435-1445.
- Petit O, Bon R (2010) Decision-making processes: The case of collective movements. *Behavioural Processes* **84**, 635-647.
- Pfeiler E (1999) Developmental physiology of elopomorph leptocephali. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **123**, 113-128.
- Pierron F, Baudrimont M, Bossy A, Bourdineaud JP, Brèthes D, Elie P, Massabuau JC (2007) Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquatic Toxicology* **81**, 304-311.
- Pierron F, Baudrimont M, Dufour S, Elie P, Bossy A, Baloché S, Mesmer-Dudons N, Gonzalez P, Bourdineaud JP, Massabuau JC (2008) How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environmental Science and Technology* **42**, 4607-4612.
- Piersma T, Drent J (2003) Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 228-233.
- Pigliucci M (2001) *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture* Johns Hopkins University Press.
- Pike TW, Laland KN (2010) Conformist learning in nine-spined sticklebacks' foraging decisions. *Biology Letters* **6**, 466-468.
- Pillot MH, Deneubourg JL (2010) Collective movements, initiation and stops: Diversity of situations and law of parsimony. *Behavioural Processes* **84**, 657-661.
- Plagnes-Juan E, Lansard M, Seiliez I, Medale F, Corraze G, Kaushik S, Panserat S, Skiba-Cassy S (2008) Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* **211**, 2510-2518.
- Podgorniak T, Angelini A, Blanchet S, de Oliveira E, Pierron F, Daverat F (2015a) Climbing experience in glass eels: A cognitive task or a matter of physical capacities? *Physiology and Behavior* **151**, 448-455.
- Podgorniak T, Milan M, Pujolar J, Maes G, Bargelloni L, De Oliveira E, Pierron F, Daverat F (2015b) Differences in brain gene transcription profiles advocate for an important role of cognitive function in upstream migration and water obstacles crossing in European eel. *Bmc Genomics* **16**, 1-10.
- Pon LB, Hinch SG, Cooke SJ, Patterson DA, Farrell AP (2009) Physiological, energetic and behavioural correlates of successful fishway passage of adult sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* in the Seton River, British Columbia. *Journal of Fish Biology* **74**, 1323-1336.
- Pon LB, Hinch SG, Suski CD, Patterson DA, Cooke SJ (2012) The Effectiveness Of Tissue Biopsy As A Means Of Assessing The Physiological Consequences Of Fishway Passage. *RIVER RESEARCH AND APPLICATIONS* **28**, 1266-1274.

- Portavella M, Torres B, Salas C (2004) Avoidance Response in Goldfish: Emotional and Temporal Involvement of Medial and Lateral Telencephalic Pallium. *Journal of Neuroscience* **24**, 2335-2342.
- Price TD, Qvarnström A, Irwin DE (2003) The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 1433-1440.
- Proulx SR, Smiley MW (2010) The evolutionary origins of gene regulation. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **314 B**, 327-340.
- Pruitt JN, Keiser CN (2014) The personality types of key catalytic individuals shape colonies' collective behaviour and success. *Animal Behaviour* **93**, 87-95.
- Pujolar JM, De Leo GA, Ciccotti E, Zane L (2009) Genetic composition of Atlantic and Mediterranean recruits of European eel *Anguilla anguilla* based on EST-linked microsatellite loci. *Journal of Fish Biology* **74**, 2034-2046.
- Pujolar JM, Jacobsen MW, Als TD, Frydenberg J, Magnussen E, Jónsson B, Jiang X, Cheng L, Bekkevold D, Maes GE, Bernatchez L, Hansen MM (2014a) Assessing patterns of hybridization between North Atlantic eels using diagnostic single-nucleotide polymorphisms. *Heredity* **112**, 627-637.
- Pujolar JM, Jacobsen MW, Als TD, Frydenberg J, Munch K, Jónsson B, Jian JB, Cheng L, Maes GE, Bernatchez L, Hansen MM (2014b) Genome-wide single-generation signatures of local selection in the panmictic European eel. *Molecular Ecology* **23**, 2514-2528.
- Pujolar JM, Maes GE, Vancoillie C, Volckaert FAM (2005) Growth Rate Correlates to Individual Heterozygosity in the European Eel, *Anguilla anguilla* L. *Evolution* **59**, 189-199.
- Pujolar JM, Maes GE, Volckaert FAM (2006) Genetic patchiness among recruits in the European eel *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology Progress Series* **307**, 209-217.
- Pujolar JM, Marino IAM, Milan M, Coppe A, Maes GE, Capoccioni F, Ciccotti E, Bervoets L, Covaci A, Belpaire C, Cramb G, Patarnello T, Bargelloni L, Bortoluzzi S, Zane L (2012) Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel. *Bmc Genomics* **13**.
- Ranz JM, Machado CA (2006) Uncovering evolutionary patterns of gene expression using microarrays. *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 29-37.
- Réale D, Reader SM, Sol D, McDougall PT, Dingemanse NJ (2007) Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews* **82**, 291-318.
- Reebs SG (1996) Time-place learning in golden shiners (Pisces: Cyprinidae). *Behavioural Processes* **36**, 253-262.
- Reebs SG (2010) Temporal complementarity of information-based leadership. *Behavioural Processes* **84**, 685-686.
- Reese E (1989) Orientation behavior of butterflyfishes (family Chaetodontidae) on coral reefs: spatial learning of route specific landmarks and cognitive maps. *Environmental Biology of Fishes* **25**, 79-86.
- Relyea RA (2002) Local population differences in phenotypic plasticity: Predator-induced changes in wood frog tadpoles. *Ecological Monographs* **72**, 77-93.
- Renault S, Daverat F, Pierron F, Gonzalez P, Dufour S, Lanceleur L, Schaefer J, Baudrimont M (2011) The use of Eugenol and the electro-narcosis as anesthetics: Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla* L.) *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**, 1573-1577.
- Renn SCP, Schumer ME (2013) Genetic accommodation and behavioural evolution: insights from genomic studies. *Animal Behaviour* **85**, 1012-1022.
- Robertson BA, Rehage JS, Sih A (2013) Ecological novelty and the emergence of evolutionary traps. *Trends in Ecology and Evolution* **28**, 552-560.
- Roelofs D, Janssens TKS, Timmermans MJTN, Nota B, Mariën J, Bochdanovits Z, Ylstra B, Van Straalen NM (2009) Adaptive differences in gene expression associated with heavy metal tolerance in the soil arthropod *Orchesella cincta*. *Molecular Ecology* **18**, 3227-3239.
- Roh K, Safaei FRP, Hespanha JP, Proulx SR (2013) Evolution of transcription networks in response to temporal fluctuations. *Evolution* **67**, 1091-1104.

- Roscoe DW, Hinch SG (2010) Effectiveness monitoring of fish passage facilities: historical trends, geographic patterns and future directions. *Fish and Fisheries* **11**, 12-33.
- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M (2006) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience* **24**, 1850-1856.
- Rudsinke W (1960) Aale haben keinen "Wassersinn"! *Fisch u. Fang* **1**, 153-154.
- Ruiz-Gomez MdL, Huntingford FA, Øverli Ø, Thörnqvist P-O, Höglund E (2011) Response to environmental change in rainbow trout selected for divergent stress coping styles. *Physiology & Behavior* **102**, 317-322.
- Ruiz-Gomez MdL, Kittilsen S, Höglund E, Huntingford FA, Sørensen C, Pottinger TG, Bakken M, Winberg S, Korzan WJ, Øverli Ø (2008) Behavioral plasticity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with divergent coping styles: When doves become hawks. *Hormones and Behavior* **54**, 534-538.
- Salas C, Broglio C, Durán E, Gómez A, Ocaña FM, Jiménez-Moya F, Rodríguez F (2006) Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish* **3**, 157-171.
- Salvanes AGV, Moberg O, Ebbesson LOE, Nilsen TO, Jensen KH, Braithwaite VA (2013) Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**, 13.
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Can molecules explain long-term potentiation? *Nat Neurosci* **2**, 597-604.
- Schmidt J (1909) *Ferskvandsaalenenes (Anguilla) udbredning i verden: Det Atlantiske ocean og tilgrænsende omraader ; en bio-geografisk studie / af Johs. Schmidt* Bianco Lunos Bogtrykkeri.
- Schmidt J (1923) Breeding places and migrations of the eel. *Nature* **111**, 51-54.
- Shahzad K, Loo JJ (2012) Application of Top-Down and Bottom-up Systems Approaches in Ruminant Physiology and Metabolism. *Current Genomics* **13**, 379-394.
- Sherrin T, Black T, Todorovic C (2011) C-Jun N-terminal kinases in memory and synaptic plasticity. *Reviews in the Neurosciences* **22**, 403-410.
- Shettleworth SJ (2010) *Cognition, Evolution, and Behavior* Oxford University Press, USA.
- Shors TJ, Matzel LD (1997) Long-term potentiation: What's learning got to do with it? *Behavioral and Brain Sciences* **20**, 597-655.
- Sih A (2011) Effects of early stress on behavioral syndromes: An integrated adaptive perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **35**, 1452-1465.
- Sih A, Bell A, Johnson JC (2004) Behavioral syndromes: An ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology and Evolution* **19**, 372-378.
- Sih A, Del Giudice M (2012) Linking behavioural syndromes and cognition: A behavioural ecology perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 2762-2772.
- Silva AT, Hatry C, Thiem JD, Gutowsky LFG, Hatin D, Zhu DZ, Dawson JW, Katopodis C, Cooke SJ (2015) Behaviour and locomotor activity of a migratory catostomid during fishway passage. *Plos One* **10**.
- Smith DR, Chapman MR (2010) Economical evolution: Microbes reduce the synthetic cost of extracellular proteins. *mBio* **1**.
- Smogor RA, Angermeier PL, Gaylord CK (1995) Distribution and abundance of American eels in Virginia streams: Tests of null models across spatial scales. *Transactions of the American Fisheries Society* **124**, 789-803.
- Snell-Rood EC (2013) An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity. *Animal Behaviour* **85**, 1004-1011.
- Sol D, Duncan RP, Blackburn TM, Cassey P, Lefebvre L (2005) Big brains, enhanced cognition, and response of birds to novel environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5460-5465.

- Sorensen C, Johansen IB, Overli O (2013) Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. *General and Comparative Endocrinology* **181**, 25-34.
- Stamps JA, Groothuis TGG (2010) Developmental perspectives on personality: implications for ecological and evolutionary studies of individual differences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 4029-4041.
- Steffensen SM, Thiem JD, Stamplecoskie KM, Binder TR, Hatry C, Langlois-Anderson N, Cooke SJ (2013) Biological effectiveness of an inexpensive nature-like fishway for passage of warmwater fish in a small Ontario stream. *Ecology of Freshwater Fish* **22**, 374-383.
- Stenseth NC, Mysterud A, Ottersen G, Hurrell JW, Chan KS, Lima M (2002) Ecological effects of climate fluctuations. *Science* **297**, 1292-1296.
- Summers CH, Winberg S (2006) Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *Journal of Experimental Biology* **209**, 4581-4589.
- Tapie N, Menach KL, Pasquaud S, Elie P, Devier MH, Budzinski H (2011) PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* **83**, 175-185.
- Tesch F-W (2003) *The eel*, Thorpe, J. E. edn. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Tesch F-W, Thorpe JE (2003) *The eel* UK : Blackwell Science : The Fisheries society of the British isles, Oxford.
- Tesch FW (1974) Influence of geomagnetism and salinity on the directional choice of eels. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* **26**, 382-395.
- Thibault I, Dodson JJ, Caron F, Tzeng W, Iizuka Y, Shiao J (2007) Facultative catadromy in American eels: testing the conditional strategy hypothesis. *Marine Ecology Progress Series* **344**, 219-229.
- Thorpe RS, Reardon JT, Malhotra A (2005) Common garden and natural selection experiments support ecotypic differentiation in the Dominican anole (*Anolis oculatus*). *American Naturalist* **165**, 495-504.
- Tischmeyer W, Grimm R (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**, 564-574.
- Tosi L, Spampanato A, Sola C, Tongiorgi P (1990) Relation of water odour, salinity and temperature to ascent of glass- eels, *Anguilla anguilla* (L.): a laboratory study. *Journal of Fish Biology* **36**, 327-340.
- Travade F (2005) Migratory fish passage at hydroelectric facilities: EDF experience. *Houille Blanche*, 60-68.
- Travade F, Larinier M, Subra S, Gomes P, De-Oliveira E (2010) Behaviour and passage of European silver eels (*Anguilla anguilla*) at a small hydropower plant during their downstream migration. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 01p01-01p19.
- Tseng YC, Hwang PP (2008) Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **148**, 419-429.
- Tsukamoto K, Aoyama J (1998) Evolution of freshwater eels of the genus *Anguilla*: A probable scenario. *Environmental Biology of Fishes* **52**, 139-148.
- Tucker DW (1959) A new solution to the Atlantic eel problem. *Nature* **183**, 495-501.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* **35**, W71-W74.
- Van Den Thillart G, Palstra A, Van Ginneken V (2007) Simulated migration of European silver eel; swim capacity and cost of transport. *Journal of Marine Science and Technology* **15**, 1-16.
- Van Ginneken V, Ballieux B, Willemze R, Coldenhoff K, Lentjes E, Antonissen E, Haenen O, Van Den Thillart G (2005) Hematology patterns of migrating European eels and the role of EVEX virus. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* **140**, 97-102.
- Van Ginneken V, Durif C, Balm SP, Boot R, Verstegen MWA, Antonissen E, Van Den Thillart G (2007) Silvering of European eel (*Anguilla anguilla* L.): Seasonal changes of morphological and metabolic parameters. *Animal Biology* **57**, 63-77.

- van Ginneken VJT, Maes GE (2005) The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: A literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **15**, 367-398.
- Van Ginneken VJT, Van den Thillart GEEJM (2000) Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* **403**, 156-157.
- van Leeuwen EJC, Haun DBM (2014) Conformity without majority? The case for demarcating social from majority influences. *Animal Behaviour* **96**, 187-194.
- Vandersteen Tymchuk W, O'Reilly P, Bittman J, MacDonald D, Schulte P (2010) Conservation genomics of Atlantic salmon: Variation in gene expression between and within regions of the Bay of Fundy. *Molecular Ecology* **19**, 1842-1859.
- Vaz-Serrano J, Ruiz-Gomez ML, GjØen HM, Skov PV, Huntingford FA, Øverli Ø, Höglund E (2011) Consistent boldness behaviour in early emerging fry of domesticated Atlantic salmon (*Salmo salar*): Decoupling of behavioural and physiological traits of the proactive stress coping style. *Physiology and Behavior* **103**, 359-364.
- Ventura MT, Paperna I (1985) Histopathology of Ichthyophthirius multifiliis infections in fishes. *Journal of Fish Biology* **27**, 185-203.
- Vilter V (1945) Développement du tractus gastro-intestinal au cours de la métamorphose de larves d'anguille. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* **139**, 223-224.
- Vollestad LA (1992) Geographic variation in age and length at metamorphosis of maturing European eel: environmental effects and phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology* **61**, 41-48.
- Vollestad LA, Jonsson B (1988) A 13-year study of the population dynamics and growth of the European eel *Anguilla anguilla* in a Norwegian river: evidence for density-dependent mortality, and development of a model for predicting yield. *Journal of Animal Ecology* **57**, 983-997.
- Vorosmarty CJ, McIntyre PB, Gessner MO, Dudgeon D, Prusevich A, Green P, Glidden S, Bunn SE, Sullivan CA, Liermann CR, Davies PM (2010) Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* **467**, 555-561.
- Wagner A (2007) Energy costs constrain the evolution of gene expression. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **308**, 322-324.
- Warburton K (2003) Learning of foraging skills by fish. *Fish and Fisheries* **4**, 203-215.
- Ward AB, Azizi E (2004) Convergent evolution of the head retraction escape response in elongate fishes and amphibians. *Zoology* **107**, 205-217.
- White EM, Knights B (1997) Environmental factors affecting migration of the European eel in the Rivers Severn and Avon, England. *Journal of Fish Biology* **50**, 1104-1116.
- Whitehead H, Richerson PJ (2009) The evolution of conformist social learning can cause population collapse in realistically variable environments. *Evolution and Human Behavior* **30**, 261-273.
- Williams JG, Armstrong G, Katopodis C, Larinier M, Travade F (2012) Thinking like a fish: A key ingredient for development of effective fish passage facilities at river obstructions. *RIVER RESEARCH AND APPLICATIONS* **28**, 407-417.
- Winberg S, Nilsson GE (1993) Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **106**, 597-614.
- Wirth T, Bernatchez L (2001) Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature* **409**, 1037-1040.
- Wolak ME, Fairbairn DJ, Paulsen YR (2012) Guidelines for estimating repeatability. *Methods in Ecology and Evolution* **3**, 129-137.
- Wolf C, Linden DEJ (2012) Biological pathways to adaptability - interactions between genome, epigenome, nervous system and environment for adaptive behavior. *Genes Brain and Behavior* **11**, 3-28.
- Wolf M, Van Doorn GS, Weissing FJ (2011) On the coevolution of social responsiveness and behavioural consistency. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**, 440-448.

- Wong RY, Lamm MS, Godwin J (2015) Characterizing the neurotranscriptomic states in alternative stress coping styles. *Bmc Genomics* **16**.
- Wood LS, Desjardins JK, Fernald RD (2011) Effects of stress and motivation on performing a spatial task. *Neurobiology of Learning and Memory* **95**, 277-285.
- Wullimann MF, Hofmann MH, Meyer DL (1991) Histochemical, connectional and cytoarchitectonic evidence for a secondary reduction of the pretectum in the European eel, *Anguilla anguilla*: a case of parallel evolution. *Brain, Behavior and Evolution* **38**, 290-301.
- Zala SM, Määttänen I, Penn DJ (2012) Different social-learning strategies in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour* **83**, 1519-1525.
- Zupanc GKH (2008) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *Journal of Physiology-Paris* **102**, 357-373.
- Zupanc GKH, Sirbulescu RF (2011) Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *European Journal of Neuroscience* **34**, 917-929.
- Zupanc GKH, Sirbulescu RF (2013) Teleost fish as a model system to study successful regeneration of the central nervous system (ed. Immunology CTiMa), pp. 193-233.